



Caractérisation d'une nouvelle protéine associée aux microtubules, SL21.

Vanessa Windscheid

► To cite this version:

Vanessa Windscheid. Caractérisation d'une nouvelle protéine associée aux microtubules, SL21.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00420153

HAL Id: tel-00420153

<https://theses.hal.science/tel-00420153>

Submitted on 28 Sep 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE
Présentée par

Vanessa WINDSCHEID

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)
Discipline : Biologie cellulaire
Spécialité : Neurobiologie

Caractérisation d'une nouvelle protéine associée aux microtubules : SL21

Soutenue le 24 Septembre 2008
Devant le jury composé de :

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| Dr Stephan Nonchev | Président |
| Dr Patrick Curmi | Rapporteur |
| Dr Franck Perez | Rapporteur |
| Dr Annie Andrieux | Directrice de thèse |

Thèse réalisée au sein de l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant
Grenoble-Institut des Neurosciences, INSERM U836, France
Groupe Physiopathologie du Cytosquelette

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Liste des abréviations..... | 1 |
| Liste des illustrations..... | 3 |
| Liste des tableaux..... | 5 |
| Avant propos..... | 6 |
| Introduction..... | 8 |
| Chapitre 1 : Le cytosquelette neuronal..... | 8 |
| I - Les microfilaments d'actine..... | 8 |
| I - 1 Structure et dynamique..... | 8 |
| I - 2 Contrôle de la dynamique de l'actine..... | 9 |
| I - 3 Rôle des microfilaments d'actine..... | 10 |
| I - 3-1 dans la structure et la motilité des cônes de croissance..... | 10 |
| I - 3-2 dans l'organisation de la synapse..... | 12 |
| II - Les filaments intermédiaires neuronaux..... | 14 |
| II - 1 Structure et dynamique..... | 14 |
| II - 2 Rôle des neurofilaments dans les neurones..... | 16 |
| III - Les microtubules..... | 16 |
| III - 1 La structure des microtubules..... | 16 |
| III - 1-1 La tubuline..... | 16 |
| III - 1-2 Les microtubules..... | 17 |
| III - 2 L'assemblage des microtubules..... | 18 |
| III - 2-1 Dynamique des microtubules <i>in vitro</i> | 18 |
| III - 2-2 Dynamique des microtubules <i>in vivo</i> | 22 |
| III - 2-3 Les modifications post-traductionnelles de la tubuline..... | 23 |
| III - 2-3-1 L'acétylation de la tubuline..... | 23 |
| III - 2-3-2 La polyglycylation de la tubuline..... | 23 |
| III - 2-3-3 La polyglutamylation de la tubuline..... | 24 |
| III - 2-3-4 La tyrosination/détyrosination de la tubuline..... | 24 |
| III - 2-3-5 La phosphorylation de la tubuline..... | 25 |
| III - 2-3-6 La palmitoylation de la tubuline..... | 26 |
| III - 3 Rôles des microtubules neuronaux..... | 26 |
| III - 3-1 Microtubules et croissance neuronale..... | 26 |
| III - 3-2 Microtubules, transport vésiculaire et maintien des organites..... | 28 |

Chapitre 2 : Les effecteurs microtubulaires neuronaux.....29

I - Les protéines stabilisatrices des microtubules.....29

I - 1 Les MAPs classiques.....29

I - 1-1 Les MAPs de type 1 (MAP1).....30

I - 1-2 Les MAPs de type 2 (MAP2).....31

I - 1-3 La protéine Tau.....33

I - 2 La protéine doublecortine (DCX).....35

I - 3 Les protéines STOPs.....36

I - 4 Compensations et/ou régulations des MAPs entre elles.....36

II - Les protéines régulatrices de la polymérisation des microtubules neuronaux..37

II - 1 La famille stathmine.....37

II - 2 La tubuline cofacteur B (TBCB).....40

III - Les moteurs moléculaires.....40

III - 1 Les kinésines.....40

III - 2 La dynéine.....41

IV - Les protéines STOPs.....42

IV - 1 Les différentes isoformes des protéines STOPs.....42

IV - 1-1 Les isoformes spécifiques des neurones.....42

IV - 1-1-1 Expression tissulaire et localisation des STOPs neuronales.....43

IV - 1-1-2 Fonctions des STOPs neuronales.....44

IV - 1-2 Les isoformes non neuronales.....45

IV - 1-2-1 Expression tissulaire et localisation des STOPs non neuronales.....46

IV - 1-2-2 Fonctions des isoformes non neuronales.....46

IV - 2 Domaines fonctionnels des STOPs.....47

IV - 2-1 Domaines de liaison aux microtubules.....47

IV - 2-2 Domaines de liaison à la calmoduline.....48

IV - 2-3 Sites de phosphorylation par la CamKII.....48

IV - 3 La souris KO STOP50

Chapitre 3 : La palmitoylation dans les neurones.....53

I - La palmitoylation.....53

I - 1 Généralités.....53

I - 2 Mécanismes de palmitoylation.....56

I - 2-1 Les Palmitoyl Acyl Transférases.....56

I - 2-2 Les Palmitoyl Thioestérases.....59

I - 3 Les sites de palmitoylation.....59

II - Rôle de la palmitoylation dans les neurones.....60

II - 1 Ciblage au membranes et Tri des protéines.....60

II - 2 Croissance axonale.....62

II - 3 Signalisation pré-synaptique.....63

II - 4 Signalisation post-synaptique.....66

II - 5 Régulation de la palmitoylation par l'activité synaptique.....68

Objectifs de travail.....69

Matériels et méthodes.....71

I - Biologie cellulaire.....71

| | |
|---|----|
| I - 1 Matériels..... | 71 |
| I - 1-1 Plasmides utilisés..... | 71 |
| I - 1-2 Anticorps primaires..... | 73 |
| I - 1-3 Anticorps secondaires..... | 74 |
| I - 2 Méthodes..... | 74 |
| I - 2-1 Culture cellulaire..... | 74 |
| I - 2-1-1 Culture des lignées cellulaires..... | 74 |
| I - 2-1-2 Culture primaire des neurones d'hippocampe de souris..... | 75 |
| I - 2-1-2-a Préparation des boîtes de cultures..... | 75 |
| I - 2-1-2-b Obtention de la suspension des neurones d'hippocampe..... | 75 |
| I - 2-2 Transfections transitoire des lignées cellulaires..... | 75 |
| I - 2-3 Traitement des cellules au 2-bromopalmitate..... | 76 |
| I - 2-4 Fixation des cellules..... | 77 |
| I - 2-5 Immunofluorescence indirecte..... | 77 |

II - Biochimie.....78

| | |
|--|----|
| II - 1 Extraits protéiques..... | 78 |
| II - 1-1 A partir de cerveaux de souris..... | 78 |
| II - 1-2 A partir de cellules en culture..... | 78 |
| II - 2 Immunoprécipitation..... | 78 |
| II - 3 Palmitoylation « <i>in vitro</i> » dans les cellules HeLa et Cos..... | 79 |
| II - 4 Détection et analyse des protéines radiomarquées | 80 |

Résultats.....81

Chapitre 1 : Palmitoylation et localisation aux membranes des protéines SL21 et N- STOP.....81

I - SL21, nouveau membre de la famille des STOPs, révèle une localisation au Golgi des STOPs.....81

| | |
|--------------------|----|
| I - 1 Résumé..... | 81 |
| I - 2 Article..... | 83 |

II – Résultats complémentaires.....93

| | |
|--|-----|
| II -1 Palmitoylation de SL21 et de N-STOP..... | 93 |
| II - 1-1 Inhibition de la palmitoylation de SL21 par le 2-bromopalmitate..... | 93 |
| II - 1-2 Localisation de SL21 en présence de 2-bromopalmitate..... | 94 |
| II - 1-3 Palmitoylation de la protéine N-STOP..... | 95 |
| II - 2 Les mutants cystéines de SL21..... | 96 |
| II - 2-1 Palmitoylation des mutants cystéines de SL21..... | 96 |
| II - 2-2 Localisation cellulaire des mutants cystéines de SL21..... | 97 |
| II - 3 Palmitoylation de SL21 endogène..... | 100 |
| II - 4 Enzymes responsables de la palmitoylation des protéines SL21 et N-STOP..... | 100 |

III - Conclusion.....103

| | |
|---|------------|
| Chapitre 2 : Les partenaires de SL21..... | 104 |
| I - Interaction de SL21 et Tctex1..... | 105 |
| I - 1 Validation de l'interaction par co-immunoprécipitation..... | 105 |
| I - 2 Détermination du site de d'interaction de Tctex1 sur SL21..... | 106 |
| II - Interaction de SL21 avec les STOPs..... | 109 |
| II - 1 Validation de l'interaction par co-immunoprécipitation..... | 109 |
| II - 2 Interaction de SL21 et de STOP endogène..... | 111 |
| III - Interaction de SL21 avec SL21..... | 111 |
| III - 1 Validation de l'interaction par co-immunoprécipitation..... | 111 |
| III - 2 Détermination du site d'interaction de SL21/SL21..... | 112 |
| III - 3 Implication de la palmitoylation dans la multimérisation de SL21..... | 113 |
| III - 3-1 Co-immunoprécipitation en présence de 2-bromopalmitate..... | 113 |
| III - 3-2 Spécificité de la co-immunoprécipitation..... | 114 |
| III - 3-3 Co-immunoprécipitation de SL21 et de ses mutants cystéines..... | 115 |
| IV - Conclusion..... | 117 |
| Discussion et perspectives..... | 118 |
| Bibliographie..... | 124 |

Abréviations

aa : acide aminé

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : Adenosine diPhosphate

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazole Propionic Acid

ARAc : Cytosine Arabinoside

ARNm : Acide ribonucléique messsager

ATP : Adenosine TriPhosphate

CamKII : Calmoduline Kinase II

CAP-Gly : Cytoskeletal Associated Protein Glycine rich

CLIP : Cytoplasmic Linker Proteins

CLASPs : CLIP-associated proteins

CoA : Coenzyme A

DCX : Doublecortine

DHHC : protéine à domaine [Acide Aspartique-Histidine-Histidine-Cystéine]

DMEM : Dubelcco's Modified Eagle's Medium

EB : End-Binding

EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

GAP-43 : Growth Associated Protein of 43 kDa

GFP : Green Fluorescent Protein

GTP : Guanosine triPhosphate

GDP : Guanosine diPhosphate

GODZ : Golgi-specific DHHC zinc finger protein

HIP14 : Huntingtin Interacting Protein of 14 kDa

IP : fraction immunoprécipitée

kDa : kiloDalton

KIF : Kinesine family

KO : Knock out

LB : Lysat Brut

LTP : Long Term Potentiation

LTD : Long Term Depression

MFs : Microfilaments d'actine

MTs : Microtubules

MTOC : Microtubule-Organizing Center

MAP : Microtubule Associated Protein
Nf : Neurofilaments
nm : nanometre
NMDA : N-Methyl-D-Aspartate
PAT : Palmitoyl Acyl Transferase
PPT : Protein Palmitoyl Thioesterase
PC12 : Pheochromocytoma cell
Pi : Phosphate inorganique
PSD : Post Synaptic Density
SCG10 : Superior Cervical Ganglion Clone 10
SDS : Sodium Dodecyl-Sulfate
SLD : Stathmine Like Domain
SLIP : SCG10 Like protein
SL21 : STOP like protein of 21 kDa
SNAP-25 : Synaptosome Associated Protein of 25 kDa
STOP : Stable Tubule Only Polypeptide
STOP-P : STOP phosphorylée
SVF : Sérum de Veau Foetal
TBCB : Tubulin Cofacteur B
TCP : Tubulin Carboxy Peptidase
Tctex1 : T-complex testis expressed 1
TGN : Trans Golgi Network
TTL : Tubulin Tyrosin Ligase

Avant-Propos

L'espace intracellulaire des cellules eucaryotes est organisé par trois systèmes filamentaires qui constituent le cytosquelette. Ces réseaux assument des fonctions et des configurations spatiales variables au cours du cycle cellulaire. Ils intègrent dans une organisation tridimensionnelle particulière le flux d'information qui parvient à la cellule.

Depuis de nombreuses années, le laboratoire s'intéresse au réseau microtubulaire. Ce réseau oscille entre diverses configurations en fonction de l'état physiologique des cellules. Ce type d'adaptation est observé, par exemple, au cours du cycle cellulaire. Durant l'interphase, les microtubules (MTs) irradiant dans tout l'espace intracellulaire à partir du centrosome (centre organisateur des MTs ou MTOC). Au cours de la mitose, le réseau microtubulaire se réorganise complètement pour former le fuseau mitotique. A ces deux types de configuration correspondent des fonctions différentes. Le réseau microtubulaire interphasique joue un rôle essentiel dans l'architecture cellulaire : il est notamment impliqué dans les transports intracellulaires, la polarité et la motilité cellulaires. Le fuseau mitotique assure, quant à lui, la migration des chromosomes durant la division cellulaire.

La réorganisation du réseau microtubulaire lors de la transition interphase-mitose met en évidence le caractère dynamique des MTs. Dans les cellules, cette dynamique est finement régulée par des effecteurs protéiques spécialisés. Le laboratoire s'intéresse à une des protéines effectrices : la protéine STOP (Stable Tubule Only Polypeptide). Cette protéine a été initialement décrite comme une MAP (Microtubule Associated Protein) impliquée dans la stabilisation au froid des MTs.

De manière à analyser les conséquences de l'absence de la protéine STOP dans l'animal entier, le laboratoire a produit des souris déficientes en protéines STOPs (STOP KO). Les souris STOP KO sont viables mais elles présentent des troubles fonctionnels importants de la transmission synaptique complexe (Potentialisation à Long terme ou LTP et Dépression à Long terme ou LTD), associés à une réduction de moitié du pool vésiculaire dans les voies glutamatergiques. Contrairement au rôle imaginé des protéines STOPs au niveau de la morphogénèse neuronale, le modèle STOP KO a mis en avant un rôle inattendu de ces protéines au niveau de la synapse. D'autres données vont dans la même direction. Les protéines STOPs sont phosphorylées par la Calmoduline-dépendante Kinase II (CamKII), qui est une enzyme impliquée dans diverses voies de signalisation synaptique (Lisman *et al.*, 2002). La présence des MTs au niveau du bouton axonal et des épines dendritiques restait controversée (Kaech *et al.*,

2001). Toutefois, il vient d'être mis en évidence par microscopie électronique (Mitsuyama *et al.*, 2008) que le réseau microtubulaire est présent au sein des dendrites durant la LTP.

Le laboratoire essaye, aujourd'hui, à comprendre comment les MTs et/ou leurs protéines effectrices participent à l'organisation fonctionnelle de la synapse. D'autre part, une protéine neuronale homologue aux protéines STOPS, la protéine SL21 (STOP Like Protein of 21 kDa) a été mise en évidence au laboratoire. Elle est de petite taille et possède plusieurs séquences homologues avec les protéines STOPS. Ceci fait de SL21 une protéine modèle de choix pour mieux comprendre la fonctionnalité des protéines STOPS.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse. La caractérisation de SL21 a permis de déterminer une nouvelle fonction de SL21 et des STOPS aux membranes, et apporte de nouveaux arguments en faveur d'un rôle des STOPS au sein de la synapse.

Avant d'exposer ces résultats de façon détaillée, nous replacerons tout d'abord des données bibliographiques qui vous présentent, dans une première partie, les différents membres du cytosquelette neuronal. Puis nous présenterons les protéines capables de réguler la dynamique des MTs neuronaux, en insistant plus particulièrement sur les protéines STOPS. La dernière partie de cette introduction sera consacrée à la description de la palmitoylation, modification post-traductionnelle clé pour la fonctionnalité de SL21 et de STOP. Enfin, ces résultats seront discutés et mis en perspective.

Chapitre 1 : Le cytosquelette neuronal

Le fonctionnement du système nerveux dépend de l'architecture des réseaux de neurones. Au cours de leur différenciation, les neurones acquièrent une morphologie complexe en devenant des cellules polarisées. Ils développent, à partir de leur corps cellulaire, différentes ramifications neuritiques : l'axone (prolongement long et fin transmettant l'information) et les dendrites (nombreux prolongements effilés et courts recevant l'information). Cette architecture leur permet d'assurer des fonctions spécialisées de collecte, d'intégration et de transfert d'information sous la forme d'influx électriques. La morphologie et la fonction des cellules neuronales sont soutenues par une réorganisation dynamique et coordonnée des différents éléments du cytosquelette. Ceux-ci peuvent être classés d'après leur diamètre en microscopie électronique : microfilaments d'actine (7 à 9 nm de diamètre), filaments intermédiaires (10 nm de diamètre) et microtubules (25 nm de diamètre).

I - Les microfilaments d'actine

I – 1 Structure et dynamique

Dans les cellules, l'actine se présente soit sous la forme de monomères d'actine G, protéines globulaires de 43 kDa, soit sous la forme d'une structure fibrillaire, l'actine F (actine filamenteuse) ou microfilaments d'actine (MFs) qui résultent de la polymérisation de l'actine G. L'actine n'existe pas de manière figée sous l'une ou sous l'autre forme mais est en permanence en équilibre entre ces deux formes. Trois types d'actine G issus de gènes différents ont été caractérisés : l'actine α , spécifique des cellules musculaires, l'actine β et l'actine γ , présentes dans tous les autres types de cellules (Khaitlina *et al.*, 2001).

L'actine G a la capacité de lier des nucléotides (ATP ou ADP) ainsi que certains cations divalents (calcium, magnésium). Le processus de polymérisation de l'actine nécessite de l'énergie et se réalise en trois étapes (Carlier *et al.*, 1991). Lors de la première étape ou étape d'activation, les monomères d'actine G lient les cations divalents et l'ATP, provoquant leur changement conformationnel. Les complexes Actine G–ATP-cations alors formés sont appelés complexes activés et ont les compétences nécessaires pour entrer dans la deuxième phase ou phase de nucléation. Trois complexes activés s'associent et forment un noyau de polymérisation. Ce noyau de polymérisation est nécessaire à la future élongation du filament. Enfin, lors de l'étape d'allongement, la polymérisation se poursuit par l'addition de monomères d'actine G aux

extrémités du noyau de polymérisation ou du filament en cours de formation (Figure 1). Le monomère d'actine G hydrolyse son ATP lors de son incorporation dans le filament (Carlier *et al.*, 1991).

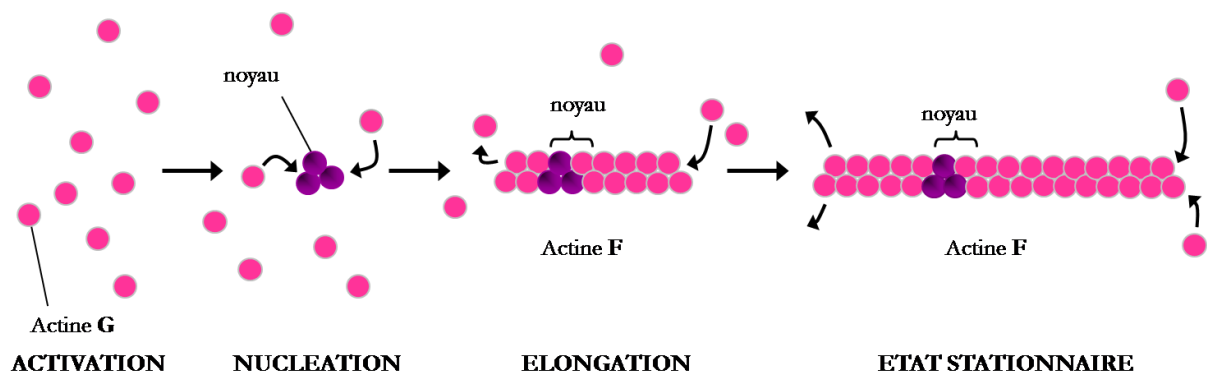


Figure 1 : Polymérisation *in vitro* de l'actine. Au cours de la nucléation, il y a assemblage d'un noyau de trois monomères d'actine G qui formera la structure de départ, nécessaire à l'élongation du filament. Le filament atteint ensuite un équilibre entre polymérisation et dépolymérisation (état stationnaire). Adapté de « Molecular biology of the cell » (4ème édition).

La polymérisation et la dépolymérisation des MFs ne se produisent pas de façon équivalente à chaque extrémité du filament : l'extrémité barbée (extrémité positive) riche en actine ATP favorisera l'assemblage des monomères, alors que l'extrémité pointue (extrémité négative) riche en Actine-ADP, favorisera plutôt leur dissociation. Le filament peut atteindre un état d'équilibre dynamique c'est-à-dire un état où la dissociation à l'extrémité pointue est compensée par l'ajout de monomères à l'extrémité barbue. La longueur du filament d'actine ne varie pas alors que les molécules d'actine G assemblées à l'extrémité barbue migrent vers l'extrémité pointue. C'est le processus « de tapis roulant » ou « treadmilling » (Wegner *et al.*, 1976).

I – 2 Contrôle de la dynamique de l'actine

Afin de pouvoir répondre à un besoin immédiat ou à un signal extracellulaire, les neurones doivent être capables de contrôler en permanence et rapidement l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine. La polymérisation, *in vitro*, de l'actine seule est extrêmement lente. Elle ne peut donc expliquer à elle seule la plupart des phénomènes dynamiques rapides. La cellule a donc à sa disposition un grand nombre de protéines particulières, les ABPs (Actin Binding Proteins ; Pollard *et al.*, 2000). Elles interagissent directement avec l'actine et peuvent

modifier ses propriétés dynamiques et/ou structurales. Elles peuvent être regroupées suivant leur rôle sur le contrôle de la dynamique et de l'organisation des filaments d'actine. Certaines peuvent contrôler simultanément plusieurs aspects de cette dynamique. Les ABPs peuvent donc :

- Maintenir une concentration élevée d'actine monomérique nécessaire au renouvellement rapide des filaments d'actine.
- Nucléer (ou initier) des filaments d'actine. Citons, par exemple, le complexe Arp2/3, les protéines Spirs ou les formines.
- Inhiber la nucléation de l'actine comme, par exemple, les protéines thymosine- β 4 calbindine et Cofiline/ADF ou bloquer la croissance des extrémités barbues (protéines de la coiffe).
- Organiser les filaments d'actine en structures élaborées. Ceci est le rôle des protéines de réticulation comme l' α -actinine, la filamine et la spectrine qui permettent de lier les filaments d'actine entre eux avec une géométrie et une élasticité particulières (câbles d'actine ou réseaux branchés denses d'actine).

I – 3 Rôle des microfilaments d'actine

Au sein des cellules, le cytosquelette d'actine est plus particulièrement responsable des phénomènes motiles et de la transmission de forces en général. L'actine filamenteuse peut exister sous la forme de longs filaments individuels, mais la plupart du temps, que ce soit pour répondre à des fonctions cellulaires précises ou pour résister à des contraintes mécaniques, les filaments d'actine sont organisés en structures élaborées qui cohabitent dans les différents types cellulaires chez les Eucaryotes.

I – 3-1 dans la structure et la motilité des cônes de croissance

Dans le neurone, et plus précisément au niveau du cône de croissance, l'actine F adopte différentes structures élaborées. Le cône de croissance contient une zone en forme d'éventail, le lamellipode qui présente de nombreuses extensions, nommées filopodes (Baker *et al.*, 2007 ; Grzywa *et al.*, 2006 ; Figure 2). Dans le lamellipode, le réseau d'actine se présente sous la forme d'un réseau branché dense et, au sein des filopodes, sous la forme de câbles d'actine (Figure 2). Les filaments d'actine, dans ces deux structures, sont majoritairement orientés avec leurs extrémités barbues au niveau de la membrane alors que les extrémités pointues sont dirigées vers le centre du cône de croissance.

La polymérisation du réseau d'actine se fait au contact de la membrane (Wang *et al.*, 1985). Le « treadmilling » de l'actine est responsable, soit directement soit par l'intermédiaire de protéines associées, de la force nécessaire à la protusion du cytoplasme au niveau de la membrane qui est, par la suite, responsable de la motilité du cône de croissance (Heidemann *et al.*, 1990 ; Tanaka *et al.*, 1995 ; Dent *et al.*, 2001 et 2003a). La motilité du cône de croissance lui permet d'explorer l'environnement extra-cellulaire afin de trouver sa cible (Dent *et al.*, 2003b ; Zito *et al.*, 2004).

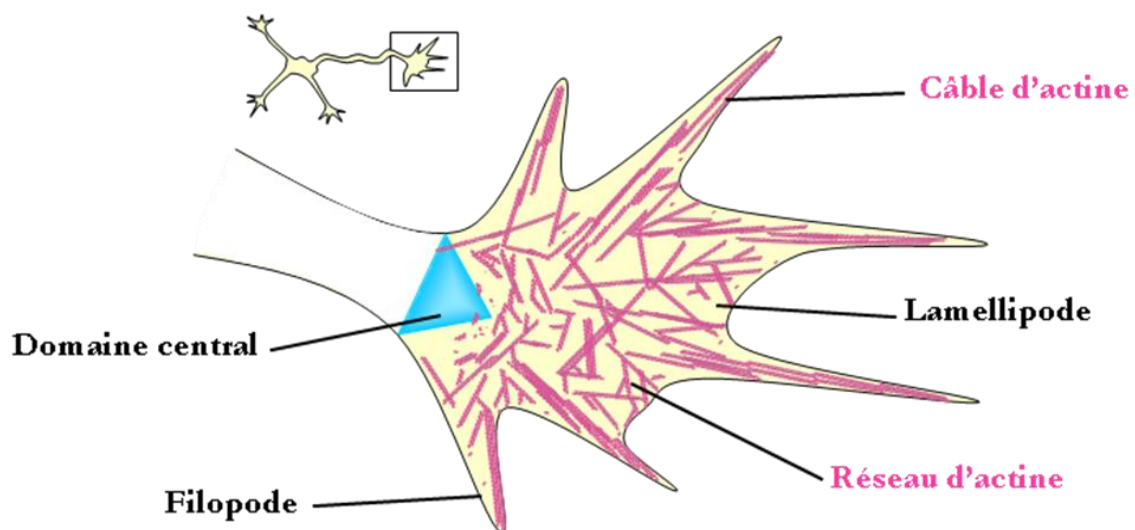


Figure 2 : Organisation du cytosquelette d'actine au sein du cône de croissance. Le cône de croissance se divise en deux parties : le domaine périphérique en jaune, le domaine central en bleu. Dans la zone périphérique du cône de croissance, l'actine est présente sous deux formes : soit sous forme de faisceaux parallèles denses (câble d'actine) au niveau des filopodes soit sous forme d'un réseau branché d'actine dans le lamellipode. Le centre du cône de croissance est dépourvu de filaments d'actine. D'après Pak *et al.*, 2008.

La formation du réseau d'actine branché est dépendante de la collaboration de nombreuses ABPs ; un modèle a été proposé (Pollard *et al.*, 2003). L'actine complexée à la profiline forme un réservoir de monomères pour la cellule. L'activation à la membrane des protéines de la famille WASP active le complexe Arp2/3 qui crée de nouvelles extrémités barbues à proximité de la membrane. L'élongation rapide de ces extrémités permet au cytosquelette de pousser la membrane vers l'avant. Rapidement, les protéines de coiffe bloquent l'élongation des filaments. L'action combinée des protéines de coiffe et du complexe Arp2/3 permet de former

des réseaux branchés denses de filaments d'actine. L'hydrolyse progressive du nucléotide ATP des filaments d'actine suivi de la dissociation du phosphate permet la fixation sur les filaments de l'ADF/cofiline qui désassemble le réseau par fragmentations successives puis dépolymérisation des petits filaments-ADP. Enfin, les monomères d'actine-ADP perdent l'ADF/cofiline à laquelle ils sont liés au profit d'une complexation avec la profiline qui accélère l'échange du nucléotide ADP pour un nucléotide ATP. Cela permet le recyclage du monomère d'actine, qui est de nouveau disponible pour polymériser à une nouvelle extrémité barbue.

I – 3-2 dans l'organisation de la synapse

La synapse est une zone de contact fonctionnelle qui s'établit entre un élément pré-synaptique ou bouton axonal et un élément post-synaptique ou épine dendritique (Figure 3). Les MFs d'actine sont très abondants dans chacune de ces structures.

Au niveau pré-synaptique, les MFs d'actine sont impliqués dans le maintien et la régulation des pools de vésicules synaptiques et dans l'exocytose. Trois pools de vésicules synaptiques sont décrits : le pool de réserve, le pool situé au niveau de la zone active de la synapse (ces vésicules sont prêtes à fusionner avec la membrane pré-synaptique) et le pool de vésicules à recycler. Les MFs permettent de positionner ces différents pools (Figure 3). En fonction de la dynamique des filaments d'actine, les vésicules pourront circuler ou rester à leur place (Dilon et Goda, 2005).

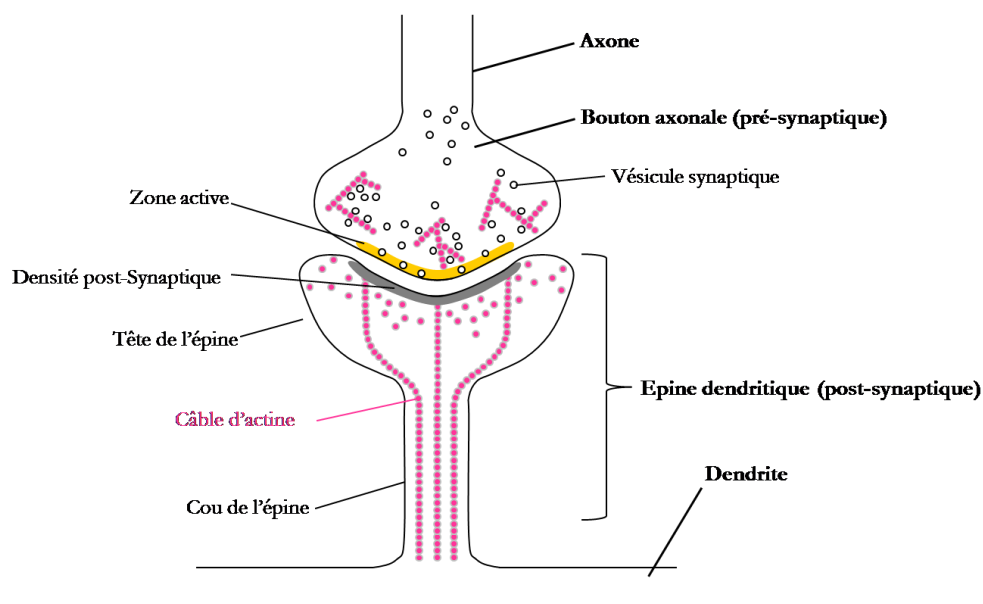


Figure 3 : Organisation du cytosquelette d'actine à la synapse. L'épine dendritique forme une synapse avec le bouton axonal, où se situent des vésicules synaptiques. L'épine dendritique se compose d'un cou et d'une tête. Au sein du cou de l'épine, le réseau d'actine est très condensé sous forme de câbles. Au niveau de la tête de l'épine, les filaments d'actine sont plus dispersés et contactent la densité post synaptique, complexe protéique dense où s'insèrent de nombreuses protéines importantes dans la synapse, comme par exemple les récepteurs aux neurotransmetteurs ou les canaux ioniques. D'après Matus *et al.*, 2000.

L'actine peut s'associer directement avec des protéines synaptiques, comme par exemple la synapsine. Cette association est nécessaire au maintien du pool de vésicules de réserve (Greengard *et al.*, 1994). L'induction de l'activité neuronale entraîne la phosphorylation de la synapsine, qui permet de déstabiliser son interaction avec l'actine et de relâcher les vésicules de réserve au niveau de la zone active (Chi *et al.*, 2001).

Au niveau post-synaptique, l'actine est très enrichie à proximité de la densité post-synaptique (PSD) où elle joue un rôle important dans l'ancrage de récepteurs en interagissant avec de nombreuses protéines d'échafaudage (Kuriu *et al.*, 2006). Elle est également impliquée dans la formation, la stabilité et la dynamique des épines dendritiques qui sont des excroissances présentes le long des dendrites des neurones (éléments post-synaptiques) (Fischer *et al.*, 1998 ; Sekino *et al.*, 2007 ; Schubert *et al.*, 2006). L'organisation de ce réseau détermine la forme de l'épine dendritique (Matus *et al.*, 2000 ; Figure 3). Au niveau du cou de l'épine dendritique, l'actine se présente sous la forme de câbles d'actine et au niveau de sa tête sous forme d'un réseau branché dense (Landis et Reese, 1983). Les changements de morphologie et la motilité des épines dendritiques sont associés au cycle de polymérisation et de dépolymérisation du réseau d'actine. Ainsi, l'addition d'un agent de dépolymérisation de l'actine F, la Cytochalasine D, bloque les

mouvements des épines (Fischer *et al.*, 1998). Une stimulation à long terme augmente la polymérisation de l'actine provoquant alors un changement de morphologie de la tête de l'épine. Plus la tête aura une taille importante, plus l'efficacité synaptique sera importante (Matus *et al.*, 2005 ; Kopec *et al.*, 2006). Cependant, la polymérisation de l'actine au niveau de la membrane synaptique influence également la diffusion des protéines et pourrait alors moduler la distribution des récepteurs AMPA vis-à-vis de la densité post-synaptique (Richards *et al.*, 2004).

II - Les filaments intermédiaires neuronaux

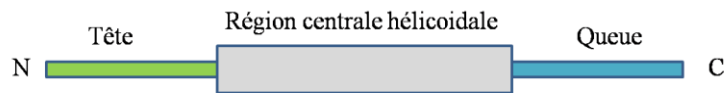
Les filaments intermédiaires sont des hétéropolymères de 10 nm de diamètre, constitués de protéines fibreuses, codées par plusieurs gènes et classées en 5 familles, selon leur homologie de séquences (filament intermédiaire de type 1 à 5). Les neurofilaments (Nfs, filaments intermédiaires de type 5) constituent les principaux filaments intermédiaires des neurones matures. D'autres filaments intermédiaires sont exprimés dans le système nerveux : la péricérine (filament intermédiaire de type 3) au niveau du système nerveux central et périphérique, l' α -internexine au niveau des neurones immatures, la nestine (filament intermédiaire de type 3/4) dans les cellules souches du système nerveux central (Lee *et al.*, 1996).

II – 1 Structure et dynamique

Les Nfs sont composés de trois sous unités : une sous unité légère NfL (61kDa), une moyenne NfM (102,5 kDa) et une lourde NfH (111kDa) (Lee *et al.*, 1996). Chaque sous-unité ou monomère est une protéine de type fibrillaire, très allongée avec une tête amino-terminale et une queue carboxy-terminale hypervariable, encadrant une région centrale α -hélicoïdale (Figure 4A). Cette région centrale contient de longues répétitions en tandem d'un motif de 7 aa caractéristiques (répétition heptade). Ce motif favorise la formation de dimères superenroulés de type « coiled-coil » (2 monomères) entre deux hélices α . Les deux monomères ont la même orientation et forment alors une structure polaire. Deux dimères superenroulés s'associent de manière anti-parallèle pour former un tétramère apolaire (4 monomères). Les tétramères s'assemblent les uns à la suite des autres pour former un protofilament (4 monomères en coupe transversale). Les protofilaments s'associent deux à deux pour former une protofibrille (8 monomères). L'assemblage de 4 protofibrilles constituent enfin un Nf (32 monomères) (Kim *et al.*, 2007 ; Figure 4B). Une fois assemblés, les Nfs sont des structures apolaires : les tétramères sont disposés en « tête à queue » tout au long du filament. Les deux extrémités résultantes sont

identiques. Les Nfs sont beaucoup plus dynamiques *in vivo* que les autres éléments du cytosquelette : l'association et la dissociation réversibles des monomères peuvent apparaître sur toute la longueur du filament et pas uniquement au niveau des extrémités (Strelkov *et al.*, 2003).

A



B

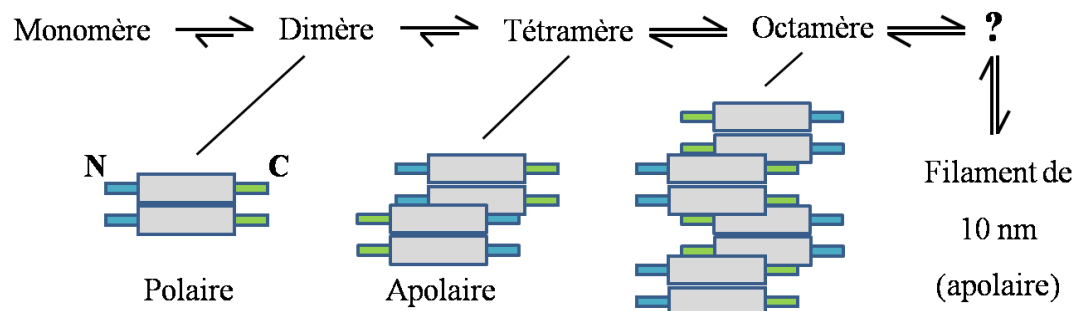


Figure 4 : Les filaments intermédiaires neuronaux (A) Représentation schématique de la structure des filaments intermédiaire neuronaux. La région centrale hélicoïdale joue un rôle important dans la formation du Nf. (B) Polymérisation des neurofilaments. Les dimères résultent de l'association parallèle de 2 monomères formant une structure polaire. L'association anti-parallèle de deux dimères forme un tétramère apolaire. L'association anti-parallèle de tétramères forme le neurofilament, structure apolaire. D'après Kim *et al.*, 2007.

Les Nfs n'ont pas de noyaux de nucléation, comme les microfilaments d'actine ou les microtubules. Leurs sous unités sont synthétisées au niveau du corps cellulaire et sont transportés dans l'axone soit sous forme d'un assemblage de sous-unités (dimères ou tétramères) soit sous forme de filaments (Julien, 2000).

Les Nfs sont les cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, transglutamination, glycosylation). La phosphorylation et la déphosphorylation des Nfs notamment, régulent leur assemblage, leur transport dans l'axone et leur interaction avec les microtubules (Petzold *et al.*, 2005).

II – 2 Rôle des neurofilaments dans les neurones

La composition et le nombre de Nfs jouent un rôle important dans la croissance radiale de l'axone et déterminent ainsi son diamètre. La vitesse de conduction de l'influx nerveux dépendant de la résistance et donc du diamètre axonal, les Nfs jouent un rôle important dans la vitesse de conduction du message nerveux le long de l'axone (Kriz *et al.*, 2000 ; Garcia *et al.*, 2003).

Un défaut du transport des Nfs entraîne leur agrégation au niveau du corps cellulaire des neurones, ce qui provoque une dégénérescence axonale (Perez-Olle *et al.*, 2005). L'agrégation des Nfs est un marqueur de certaines pathologies neurodégénératives, telles que la Sclérose Latérale Amyotrophique (Nixon *et al.*, 1993).

Les neurofilaments participent aussi à la localisation de certains organites intracellulaire, notamment les mitochondries et l'appareil de Golgi (Toivola *et al.*, 2005 ; Wagner *et al.*, 2003).

III - Les microtubules

Les microtubules (MTs) sont un des composants majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes et sont impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires comme la mitose, le maintien et la modification de la forme de la cellule et les mouvements intracellulaires des organites et des vésicules.

III – 1 La structure des microtubules

III - 1-1 La tubuline

Sept tubulines différentes sont décrites (Dutcher *et al.*, 2001). Les plus étudiées sont les tubulines α et β , qui forment un hétérodimère de tubuline, unité structurale de base des MTs. La tubuline γ est impliquée dans les premières étapes de la formation des MTs (lors de la nucléation). Il a été montré qu'elle est intégrée dans des complexes multi-protéiques en forme d'anneaux : les γ -TURCs (γ -Tubulin Ring Complexes). Ces structures appartiennent au matériel péri-centriolaire et sont les sites de nucléation des MTs (Dutcher *et al.*, 2001 ; Moritz *et al.*, 1995 et 2001 ; Job *et al.*, 2003). La tubuline δ est nécessaire à l'association du flagelle chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, la tubuline η est indispensable à la duplication des corps basaux (analogues des centrioles chez la Paramécie). Et enfin, les tubulines ϵ et ζ n'ont pas encore de fonctions connues.

Dans ce propos, je m'intéresserai essentiellement aux tubulines α et β . Chez les Mammifères, sept isoformes de tubuline α et huit de tubuline β sont décrites. Toutefois, le séquençage complet du génome humain a révélé la présence de plusieurs autres gènes codant pour d'avantages de tubulines α et β . Certaines isoformes sont spécifiquement exprimées dans le

cerveau comme par exemple les tubulines β_{II} , β_{III} , β_{IV} et les tubulines α_1 , α_2 et α_4 alors que d'autres sont ubiquitaires telles que β_1 (Raff *et al.*, 1994 ; Banerjee *et al.*, 2002).

Les tubulines α et β sont des protéines globulaires d'environ 450 aa et d'un poids moléculaire apparent de 50 kDa. Elles s'assemblent pour former un hétérodimère de tubuline α/β capable de lier deux molécules de GTP : l'une est non-échangeable et non-hydrolysable en GDP et se situe au niveau de la sous unité α , l'autre est échangeable et hydrolysable en GDP et phosphate inorganique et se situe au niveau de la sous unité β (Yanagisawa *et al.*, 1968 ; Mandelkow, 1988).

La structure du dimère de tubuline α et β a été déterminée d'une part par diffraction électronique et par cristallographie dans le cas d'une étude du complexe tubuline-stathmine et se divise classiquement en trois parties : une partie amino-terminale contenant le site de liaison échangeable du GTP, une partie intermédiaire possédant le site de liaison du taxol (molécule de stabilisation des MT) et une partie carboxy-terminale qui expose les résidus carboxy-terminaux de l' α -tubuline à l'extérieur du dimère mais également à l'extérieur du MT (Lowe *et al.*, 2001 ; Gigant *et al.*, 2000 ; Ravelli *et al.*, 2004).

III – 1-2 Les microtubules

La structure des MTs a essentiellement été révélée par microscopie électronique à transmission. Les MTs sont formés d'hétérodimères de tubuline alignés le long de 13 +/- 2 lignes de directions appelées protofilaments (Figure 5 ; Mandelkow *et al.*, 1984b). Au total, la surface d'un MT est un arrangement régulier de sous-unités de tubuline et toutes ces sous-unités présentent la même orientation le long des protofilaments de sorte que chaque protofilament est constitué d'un enchaînement ordonné d'hétérodimères $\alpha\beta$ (Figure 5 ; Harriison *et al.*, 1993). De ce fait, les MTs ont une polarité structurale. Ils sont formés d'une extrémité négative (« bout moins ») exposant les sous unités α et l'autre extrémité positive (« bout plus ») portant les sous unités β (Mitchison *et al.*, 1993, Figure 5).

L'arrangement des sous-unités est décrit à l'aide d'hélices de dimères qui font du MT une structure hélicoïdale (Dustin *et al.*, 1980). Au vue du nombre de protofilaments (en général, 13), les hélices du MT ne sont pas continues mais s'alignent sur une ligne appelée ligne de suture (Kikkawa *et al.*, 1994 ; Figure 5).

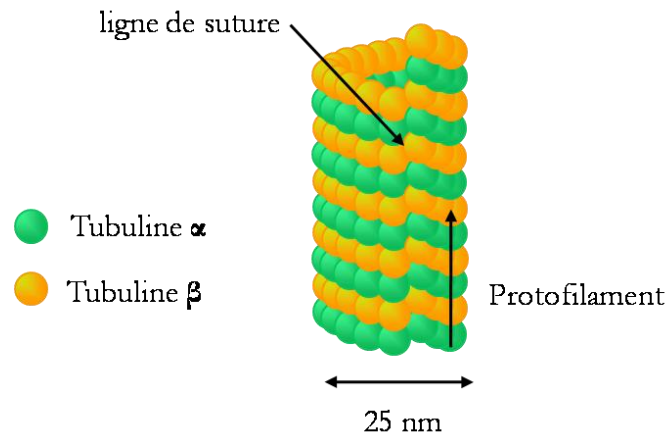


Figure 5 : Structure des microtubules. Les hétérodimères de tubuline α et β s'associent entre eux pour former les protofilaments. 13 protofilaments interagissent latéralement pour former un tube creux de 25 nm appelé microtubule. Ce MT présente une irrégularité dans l'arrangement des dimères au niveau de la ligne de suture.

III - 2 L'assemblage des microtubules *in vitro*

Les hétérodimères de tubuline α et β sont capables de s'auto-assembler *in vitro* sous certaines conditions : en présence d'une concentration suffisante de tubuline pure dite « concentration critique », de molécules de GTP, de magnésium et d'une température supérieure à 20°C. Cet assemblage se déroule en différentes étapes : nucléation, élongation et désassemblage.

III - 2-1 Nucléation

Lors de la nucléation, les hétérodimères de tubuline s'associent entre eux. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer cette nucléation.

- Soit les dimères de tubuline forment des protofilaments qui interagissent latéralement pour constituer les MTs (Flyvbjerg *et al.*, 1996 ; Figure 6A).
- Soit la nucléation des MTs a lieu en deux étapes avec la formation de complexes intermédiaires (Caudron *et al.*, 2002 ; Job *et al.*, 2003 ; Figure 6). Ces complexes contiendraient un nombre limité de dimères et sont appelés pour cela oligomères de tubuline. Certains dimères ne sont pas complexés au sein des oligomères et restent disponibles. Ces oligomères constituent un noyau actif sur lequel les dimères de tubuline libres vont s'associer pour former des feuillets de tubuline qui aboutiront enfin à la constitution des MTs (Figure 6B).

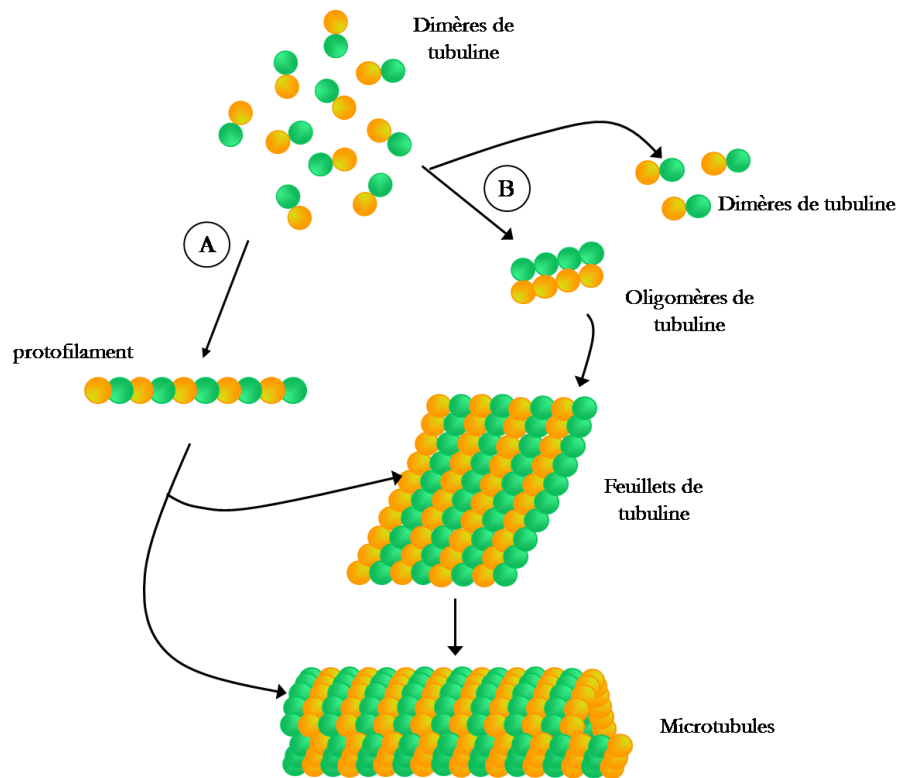


Figure 6 : Modèle de la nucléation des microtubules *in vitro*. La nucléation est l'étape de formation des MTs. Différents modèles ont été proposés : en **A**/, les MTs se forment à partir d'un arrangement régulier d'hétérodimère de tubuline appelé protofilament. En **B**/, les MTs se forment à partir des oligomères de tubuline qui forme un noyau sur lequel les dimères de tubuline libres vont s'ajouter. D'après Job *et al.*, 2003.

III - 2-2 Elongation

Les MTs vont ensuite polymériser par addition d'hétérodimères de tubuline-GTP aux extrémités du MT. Au cours de cette étape, la molécule de GTP associée à la tubuline β est hydrolysée (Hyman *et al.*, 1992). La conséquence de l'hydrolyse du GTP est le désassemblage des MTs. Le MT s'allonge alors quand la vitesse d'addition de la tubuline-GTP sur une des extrémités est plus rapide que la vitesse d'hydrolyse du GTP.

III – 2-3 Désassemblage

Le désassemblage se produit spontanément après l'hydrolyse du GTP. Des dimères de tubuline sont alors libérés. Une dilution de la tubuline, une exposition au froid, un ajout de calcium dans la solution ou une incubation avec des drogues anti-microtubulaire comme la colchicine (alcaloïde se fixant lentement et irréversiblement aux dimères de tubuline, causant ainsi le désassemblage des MTs) ou le nocodazole (substance inhibitrice de la polymérisation des MTs) entraîne le désassemblage des MTs en tubuline-GDP au niveau de leur extrémité.

III –3 Dynamique des MTs à l'état stationnaire

L'état stationnaire correspond à une phase où la concentration en tubuline libre est égale à la concentration critique. Les MTs n'étant pas des structures inertes mais dynamiques, ils échangent en permanence leur sous-unité de tubuline avec le milieu (Johnson et Borisy, 1977). Ils sont alors caractérisés par deux comportements distincts :

- Le phénomène de « tapis roulant » ou « treadmiling » (Margolis et Wilson, 1981) : la polarité des MTs influence la cinétique d'assemblage et de désassemblage des dimères de tubuline à chaque extrémité du MT. Les dimères de tubuline s'associent au MT au niveau de l'extrémité où la cinétique d'assemblage nette est la plus élevée (extrémité β ou positive) alors que les dimères se dissocient au niveau de l'extrémité où la cinétique d'assemblage nette est la plus faible (extrémité α ou négative) (Figure 7A). De ces différences d'assemblage résulte un flux de sous unités de tubuline dans le MT ou phénomène de tapis roulant (Figure 7B et 7C). Même si la longueur des MTs peut ne pas varier, il existe tout de même un flux de tubuline de l'extrémité positive vers l'extrémité négative des MTs.

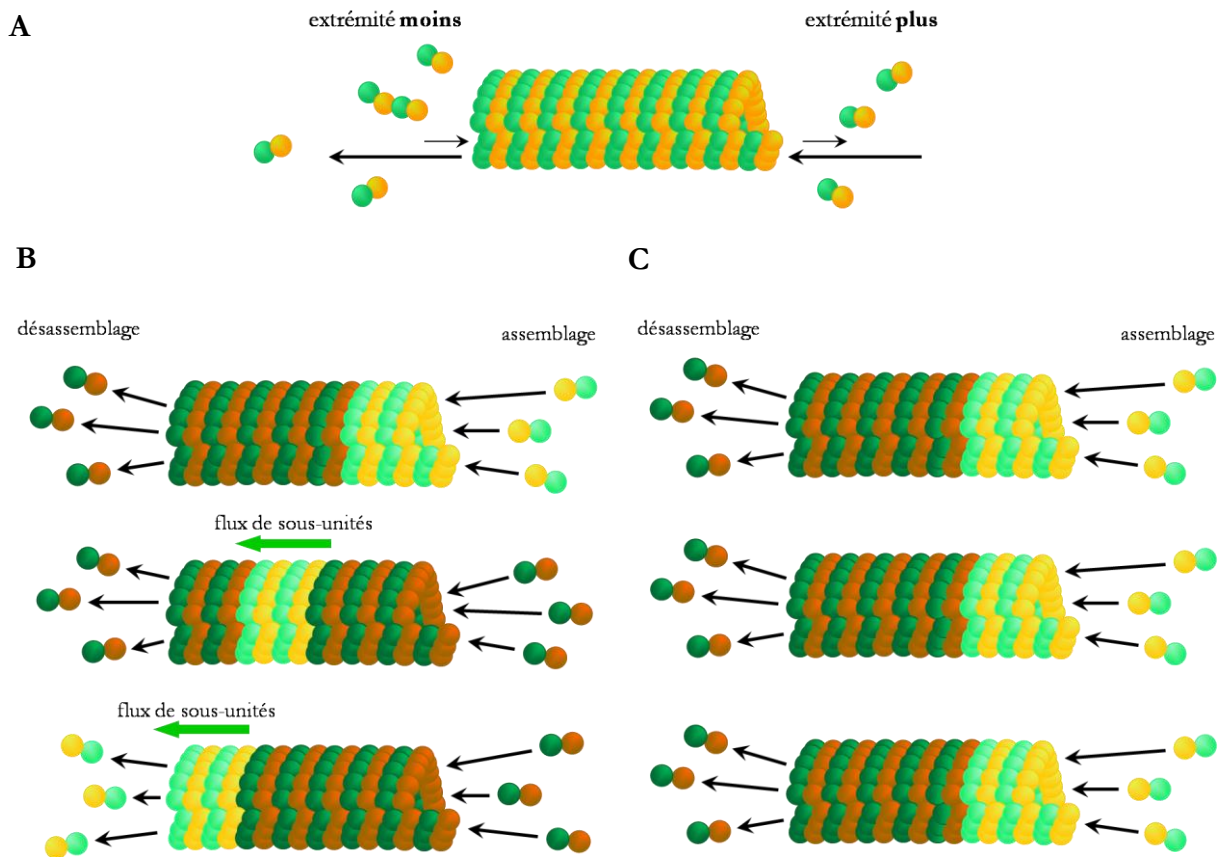


Figure 7 : La polarité et le processus de « tapis roulant » des microtubules. **A/ La polarité des microtubules :** L'extrémité « plus » est l'extrémité où l'incorporation de tubuline est favorisée et l'extrémité « moins » est celle où la perte de tubuline est plus importante. **B/ Représentation schématique du processus de « tapis roulant » des microtubules ayant une extrémité attachée.** Pour suivre le comportement des hétérodimères de tubuline, certains ont été représentés de couleurs plus claires ou plus foncées. Des dimères de tubulines s'ajoutent séquentiellement à l'extrémité d'assemblage, si bien qu'ils s'éloignent de plus en plus de cette extrémité. Dans le même temps, des dimères sont libérés au niveau de l'extrémité de désassemblage. Le dimère semble donc traverser le MT de l'extrémité d'association vers l'extrémité de dissociation. **C/ Représentation schématique du processus de « tapis roulant » des microtubules ayant leur deux extrémités libres.**

- L'instabilité dynamique (Figure 8). Elle a été mise en évidence en mesurant la longueur des MTs en état stationnaire (Mitchison et Kirschner, 1984). Alors que la quantité de tubuline assemblée est constante, la longueur moyenne des MTs fluctue fortement : il existe des MTs qui assemblent et d'autres qui désassemblent même si la concentration en tubuline reste constante. Ceci a été nommé « instabilité dynamique de la croissance microtubulaire ». Cette instabilité a ensuite été observée sur des MTs individuels grâce à la vidéomicroscopie (Bayley *et al.*, 1994 ; Figure 8A). Des MTs ont été suivis au cours du temps et leur longueur mesurée. Les MTs subissent successivement un assemblage (addition de dimères) qui allonge le MT puis un désassemblage rapide (dissociation de dimères) qui raccourcit le MT (Figure 8A). Les transitions entre la phase d'assemblage (polymérisation) et la phase de désassemblage (dépolymérisation)

sont appelées catastrophes et les transitions entre la phase de désassemblage et la phase d'assemblage sont nommées sauvetages (Figure 8 A et B). Les MTs ne sont pas toujours en phase d'assemblage ou de désassemblage, ils peuvent également être en pause. Cet état est beaucoup plus rare (Walker *et al.*, 1988).

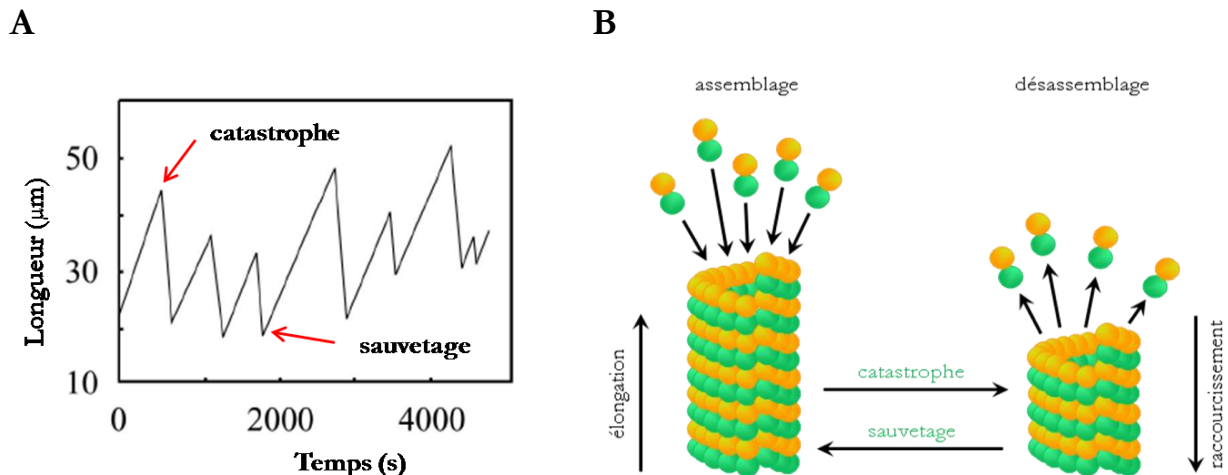


Figure 8 : Dynamique des microtubules. (A) Evolution au cours du temps de la longueur d'un microtubule à l'état stationnaire observé en vidéomicroscopie (Bayley *et al.*, 1994). (B) L'instabilité dynamique correspond à une oscillation de périodes d'élongation qui durent jusqu'à un point critique dit catastrophe, où le microtubule dépolymérise fortement pour ensuite se reformer au cours du sauvetage.

L'instabilité dynamique nécessite de l'énergie qui provient de l'hydrolyse du GTP sur la tubuline β . La polymérisation du MT est suivie de l'hydrolyse du GTP en GDP. Il a été montré, à l'aide d'analogues non hydrolysables de GTP, que l'hydrolyse de ce dernier ne joue pas un rôle dans l'assemblage mais est au contraire impliqué dans la dépolymérisation (Erickson et O'Brien, 1992). En effet, la formation du GDP entraîne un changement conformationnel des sous-unités et un affaiblissement des liaisons entre dimère et polymère, favorisant la dépolymérisation. Des dimères de tubuline sont additionnées aux extrémités des MTs (Hyman *et al.*, 1992). En revanche, l'hydrolyse du GTP est nécessaire pour déstabiliser la paroi du MT et permettre par la suite sa dépolymérisation.

Le mécanisme permettant d'expliquer le phénomène d'instabilité dynamique n'est pas connu précisément. Le modèle de « la coiffe GTP » pourrait l'expliquer (Mitchison et Kirschner, 1984 ; Carlier et Pantaloni, 1981). Il est fondé sur deux états conformationnels de la tubuline : un état GDP instable constituant l'essentiel du MT et un état GTP stable coiffant l'extrémité positive du MT. La polymérisation rapide est favorisée par la forte affinité des sous-unités de tubuline-GTP libre pour la coiffe. Tant que cette « coiffe GTP » persiste, le MT ne dépolymérise pas. La

perte aléatoire de la coiffe entraînerait une catastrophe et une dépolymérisation rapide du MT (Erickson and O'Brien, 1992).

III - 4 La dynamique d'assemblage des microtubules *in vivo*

III – 4-1 Organisation des MTs neuronaux

Dans la majorité des cellules non neuronales, les MTs sont nucléés à partir d'un centre organisateur appelé centrosome. Leurs extrémités négatives sont ancrées au niveau du centrosome alors que leurs extrémités positives irradient dans tout le cytoplasme. Il en est de même dans les cellules neuronales non différenciées. Dans les cellules neuronales différenciées, les MTs ne sont plus ancrés au niveau du centrosome (Baas *et al.*, 1994 ; Wenquian *et al.*, 1993). Ils sont nucléés au niveau du centrosome mais sont ensuite transportés dans les extensions neuritiques. Les MTs neuritiques sont en effet très organisés : dans les axones, leur extrémité négative est située au niveau du corps cellulaire et leur extrémité positive pointe vers la terminaison axonale. Mais dans les dendrites, les MTs sont orientés dans les deux sens (Black et Bass, 1989). Il a été montré que l'extrémité positive de certains MTs axonaux pouvait servir de centre de nucléation relais (Ahmad et Baas, 1992) ; les MTs ne pouvant pas être continus sur toute la longueur de l'axone.

Les MTs sont également très dynamiques dans les cellules : ils se renouvellent en permanence par des phases d'assemblage et de désassemblage. Les mécanismes d'instabilité dynamique et de « treadmilling » ont été également mis en évidence *in vivo* (Cassimeris *et al.*, 1988 ; Rodionov et Borisy, 1997). Cette dynamique est plus lente qu'*in vitro*, elle est variable selon le type de cellules, les MTs neuronaux étant particulièrement stables comparés aux MTs d'autres types cellulaires (Seitz-Tutter *et al.*, 1988). Cette particularité s'acquiert progressivement au cours du développement et de la maturation des extensions neuritiques (Lim *et al.*, 1989). La dynamique des MTs est finement régulée dans le neurone par différents facteurs : des protéines associées aux microtubules ou MAPs (Microtubule Associated Protein ; je décrirai ces MAPs dans mon deuxième chapitre), des protéines capable de lier les « bouts plus » des MTs (nommés +TIPs), des protéines séquestrant les hétérodimères de tubuline et enfin des modifications post-traductionnelles qui touchent la tubuline.

III - 4-2 Les modifications post-traductionnelles de la tubuline

La tubuline peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles, générant une grande diversité dans les populations de microtubules (Westermann et Weber, 2003). Toutes ces modifications post-traductionnelles représentent un véritable « code tubuline », comparable au

code histone qui régule l'assemblage de la chromatine et la transcription des gènes (Verhey et Gaertig, 2007). Ce code module la fonction de la tubuline mais influence également le recrutement des effecteurs microtubulaires comme les MAPs et régule alors les fonctions liées aux MTs (Hammond *et al.*, 2008). Toutes ces modifications ont lieu au niveau des sous-unités de tubuline déjà incorporées dans les MTs sauf pour la phosphorylation de la serine 172 de la tubuline β qui a lieu sur la tubuline non-polymérisée (Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006). Ces différentes modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu sur des sites très proches, ce qui laisse penser qu'une modification peut influencer le taux ou l'activité des enzymes d'autres modifications.

III - 4-2-1 L'acétylation de la tubuline

La tubuline α peut être acétylée au niveau de la lysine 40, orientée vers la lumière du MT (Nogales *et al.*, 1999). L'ajout d'un groupement acétyl est réalisé par une acétyltransférase (non-identifiée) et son retrait par une déacétylase HDAC6, qui présente une homologie de séquence avec la famille des Histones DéACétylase et par la protéine SIRT2 (Silent information Regulator 2) (Hubbert *et al.*, 2002 ; North *et al.*, 2003). L'acétylation est souvent associée à un état stable et à une plus grande résistance vis-à-vis des drogues dépolymérisantes des MTs. L'acétylation augmente notamment l'affinité du moteur moléculaire kinésine1 pour les MTs, *in vitro* et *in vivo* (Reed *et al.*, 2006). La déacétylation de la tubuline par SIRT2 est impliquée dans la différenciation oligodendrocytaire (Teng *et al.*, 2008).

III - 4-2-2 La polyglycylation de la tubuline

La polyglycylation consiste en l'ajout de résidus glycine (jusqu'à plus de 30 résidus) sur un résidu glutamate présent au niveau carboxy-terminal des tubulines α et β (Redeker *et al.*, 1994). Elle est essentiellement retrouvée dans les axonèmes des Ciliés, comme par exemple chez la paramécie (Bre *et al.*, 1998).

III - 4-2-3 La polyglutamylation de la tubuline

La polyglutamylation consiste à ajouter une chaîne de résidus glutamate sur des résidus glutamate, situés au niveau carboxy-terminal des tubulines α et β (Edde *et al.*, 1990 ; Alexander *et al.*, 1991). Cette modification est prépondérante dans les neurones de Mammifères : elle est présente essentiellement au niveau des MTs stables des axones. Cette réaction est réversible : l'addition de glutamate est réalisée par des glutamylases TTLLs (TTL-like enzymes) (Audebert *et al.*, 1993 ; Janke *et al.*, 2005). Au cours du développement neuronal, la polyglutamylation augmente et contrôle l'interaction des différentes MAPs avec les MTs : les protéines Tau,

MAP1B, et MAP2 ont une affinité diminuée pour les MTs très polyglutamylés alors que la protéine MAP1A se lie préférentiellement à la tubuline polyglutamylée (Audebert *et al.*, 1994 ; Bonnet *et al.*, 2001). Mais également, elle influence la processivité du moteur moléculaire kinesine (Thorn *et al.*, 2000).

III - 4-2-4 La tyrosination/détyrosination de la tubuline

La tubuline α est synthétisée avec une tyrosine comme aa carboxy-terminal, on la nomme « tubuline Tyr ». Cette tyrosine peut être clivée par une Tubuline CarboxyPeptidase (TCP) encore non-identifiée. La tubuline α expose ainsi un résidu glutamate, elle est alors nommée « tubuline Glu ». Une tyrosine peut être remise en place grâce à la Tubuline Tyrosine Ligase (TTL) (Barra *et al.*, 1988 ; MacRae *et al.*, 1997 ; Figure 9). La « tubuline Glu » peut subir un autre clivage enzymatique et perdre son résidu glutamate carboxy-terminal, la tubuline qui en résulte est appelée tubuline $\Delta 2$ (Figure 9 ; Paturle-Lafanéchère *et al.*, 1991).

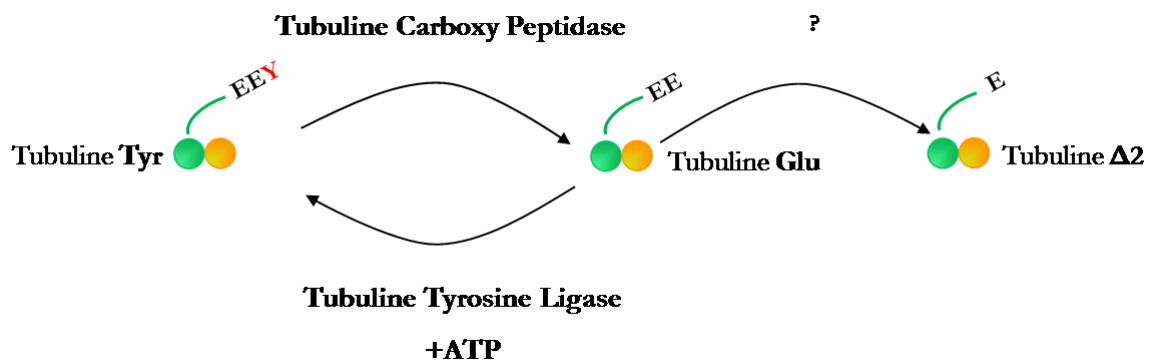


Figure 9 : Le cycle de détyrosination-tyrosination de la tubuline α . La Tubuline Carboxy Peptidase clive la tyrosine carboxy-terminale de la tubuline α , produisant ainsi de la tubuline détyrosinée ou « tubuline Glu ». Cette « tubuline Glu » peut être le substrat de la tubuline tyrosine ligase qui ajoute une nouvelle tyrosine. La « tubuline Glu » peut également être le substrat d'une carboxy-peptidase clivant le glutamate carboxy-terminal de la « tubuline Glu », ce qui produit la tubuline $\Delta 2$.

La tyrosination de la tubuline par la TTL survient uniquement sur les dimères de tubuline libre alors que la TCP, même si elle n'est pas connue, agirait préférentiellement sur les MTs assemblés (Webster *et al.*, 1987 ; Wehland and Weber, 1987). La détyrosination traduit la durée de vie d'un MT. En effet, plus un MT est détyrosiné, plus le début de sa polymérisation est ancienne (Khawaja *et al.*, 1988). D'un point de vue quantitatif, les MTs neuronaux contiennent environ

20% de tubuline tyrosinée, 40% de tubuline détyrosinée et 40% de tubuline- $\Delta 2$ (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1994). Cette tubuline $\Delta 2$ est une isoforme de tubuline spécifiquement présente dans les neurones différenciés, aussi bien dans les dendrites que dans les axones (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1994 ; Guillaud *et al.*, 1998). L'invalidation du gène codant pour la TTL a permis de mettre en évidence que le cycle détyrosination/tyrosination de la tubuline α est impliquée dans la différenciation neuronale, le positionnement du noyau et la morphogénèse (Erck *et al.*, 2005 ; Peris *et al.*, 2006). La perte de l'activité TTL accompagne la progression tumorale ce qui indiquerait que la TTL est un possible suppresseur de tumeur (Lafanechère *et al.*, 1998).

III - 4-2-5 La phosphorylation de la tubuline

Lors de la purification de tubuline de cerveau, de la tubuline β phosphorylée a été identifiée (Eipper *et al.*, 1972). La phosphorylation de la tubuline, notamment de la tubuline β III, intervient dans la différenciation et la croissance neuritique des cellules de neuroblastomes de souris en culture (Gard and Kirschner, 1985). Cette phosphorylation dépend de la quantité de tubuline assemblée en MTs car le taxol (qui stabilise les MTs) augmente la quantité de tubuline phosphorylée alors que le nocodazole (qui entraîne une dépolymérisation des MTs) diminue cette quantité. Potentiellement, la phosphorylation de la sérine 172 de la tubuline β par le complexe Cdk1/Cycline B pourrait gêner la liaison du GTP sur la tubuline β ou les interactions interdimères (Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006).

III - 4-2-6 La palmitoylation de la tubuline

La palmitoylation de la tubuline (c'est-à-dire l'ajout d'un acide palmitique : cette modification post-traductionnelle fera l'objet du chapitre III de cette introduction) intervient sur la cystéine 376 de la tubuline α (Caron *et al.*, 1997 ; Ozols and Caron, 1997). Cette modification permettrait de localiser la tubuline à la membrane (Zambitto et Wolff, 2001).

III – 5 Rôles des microtubules neuronaux

Dans les neurones, les MTs jouent un rôle majeur dans la mise en place et le maintien de leur morphologie asymétrique mais ont également des rôles structuraux et motiles clés dans le transport des vésicules ou des organites dans leur cytoplasme et dans leurs extensions neuritiques (Hyams et Lloyd, 1994). Cette diversité fonctionnelle s'explique par une grande diversité des réseaux microtubulaires au niveau de leurs propriétés dynamiques et structurales.

III – 5-1 Microtubules et croissance neuronale

Lors des premiers stades de différenciation des neurones primaires en culture, l'invasion de protusions membranaires par des MTs seuls ou en faisceaux parallèles, émergeant du soma, signe le début du développement neuritique. Ensuite, ce réseau de faisceaux parallèles de MTs qui présentent leurs extrémités positives au niveau distal du lamellipode va permettre à la membrane de se condenser pour former un petit neurite, possédant à son extrémité un cône de croissance riche en actine (Dotti, *et al.*, 1988, paragraphe I - 2). Les MTs vont se stabiliser et permettre alors aux neurites d'être « en pause ». La croissance axonale va ensuite dépendre de la dynamique des MTs axonaux et des microfilaments d'actine (Lasek *et al.*, 1986 ; Bamburg *et al.*, 1986 ; voir paragraphe I - 2).

Au cours de la différenciation neuronale, le neurone se polarise quand un des neurites accélère sa croissance pour devenir un axone. Cet axone ainsi que les autres neurites, appelés les dendrites possèdent à leur extrémité un cône de croissance. Les MTs ont une organisation particulière au sein de ce cône de croissance. En effet, ils se présentent sous la forme de paquets stables dans la région centrale et sous forme de filaments isolés très dynamiques à la périphérie du lamellipode (Dent et Gertler, 2003, Figure 10). Le réseau de MTs présent dans la région périphérique interagit avec le réseau d'actine, permettant une régulation réciproque (Rochlin *et al.*, 1999), nécessaire aux mouvements du cône de croissance dans l'exploration de l'espace cytoplasmique (Zhou *et al.*, 2002). L'inhibition de cette dynamique dans les cônes de croissance a en effet mis en évidence son implication dans le choix de la direction axonale (Tanaka et Kirschner, 1991 ; Challacombe *et al.*, 1997).

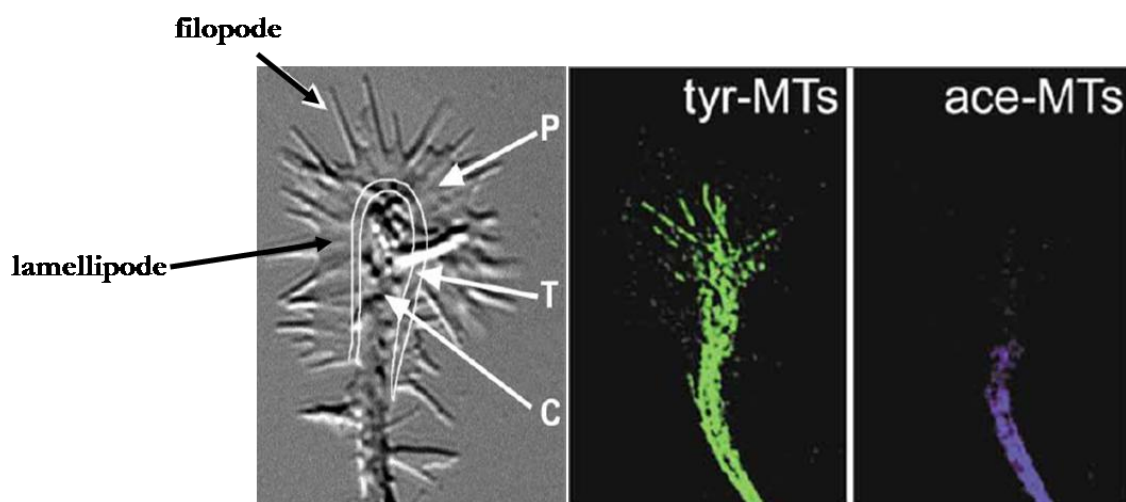


Figure 10 : Organisation du cytosquelette du cône de croissance. Dans un cône de croissance en développement, les MTs tyrosinés dynamiques (tyr-MTs) se localisent au niveau de la région périphérique (P sur la figure). Les MTs acétylés stables (ace-MTs) sont concentrés dans la région centrale (C sur la

figure) et dans l'axone. D'après Dent et Getler, 2003.

Nous venons de mettre en exergue le rôle essentiel de la dynamique des microtubules dans la fonction neuronale. Leur polarité est aussi une caractéristique importante : elle permet d'établir une différence morphologique et fonctionnelle entre les deux types de prolongements neuronaux (Mandell *et al.*, 1995). Dans les axones, les MTs sont tous orientés avec leur extrémité positive vers le cône de croissance alors que dans les dendrites, ils sont orientés dans les deux sens, de façon aléatoire (Baas *et al.*, 1991). Il est aussi important de noter que dans les axones les MTs sont orientés de façon parallèle alors que dans les dendrites ils ont une orientation aléatoire. L'orientation parallèle permettrait de générer des forces de compression qui s'opposent à la tension exercée lors de l'allongement de l'axone. Cette force est plus faible dans les dendrites du fait de l'orientation aléatoire des MTs. Les dendrites s'allongent uniquement s'ils compensent la tension de surface par une adhésion accrue sur leurs supports (Prochiantz *et al.*, 1995). Ces observations pourraient expliquer les différences de longueur entre les dendrites et l'axone.

Très récemment, la présence de petits MTs au niveau des épines dendritiques a été mise en évidence après un protocole de potentialisation à long terme (LTP), en microscopie électronique (Mitsuyama *et al.*, 2008)

III –5-2 Les microtubules dans le transport vésiculaire et le maintien des organites

Dans le neurone, la synthèse protéique se situe majoritairement au niveau du soma, des dendrites et de leurs épines (Ehlers *et al.*, 2000 ; Huber *et al.*, 2000). Le réseau microtubulaire sert de « rails » sur lesquels les moteurs moléculaires (dynéine et kinésines) vont spécifiquement s'associer pour permettre le transport des vésicules-cargo, du corps cellulaire jusqu'à l'extrémité axonale (Hirokawa *et al.*, 1998) ou inversement. Les MTs sont également importants pour le transport des vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et entre le réseau trans Golgien (TGN) et la membrane plasmique. Ils sont également impliqués au routage des ARNm nécessaires à la traduction de certaines protéines au niveau du cône de croissance axonale, comme par exemple le transport des ARNm de l'actine ou de la tubuline (Vale et Fletterick, 1997 ; El-Husseini *et al.*, 2002 ; Eng *et al.*, 1999).

Les MTs jouent également un rôle dans le maintien de l'organisation des organites comme l'appareil de Golgi. En présence de nocodazole, drogue qui entraîne la dépolymérisation des MTs, les empilements de membranes golgiennes se déconnectent, se dispersent dans tout le

cytoplasme et forment alors des petits fragments golgiens qui restent tout de même fonctionnels (Thyberg *et al.*, 1999).

Chapitre 2 : Les effecteurs microtubulaires neuronaux

Lors de la purification de préparations enrichies en microtubules, réalisées à partir d'extrait de cerveaux, et après plusieurs cycles de polymérisation/dépolymérisation des MTs, une fraction protéique associée aux MTs polymérisés persiste (Sloboda *et al.*, 1976 ; Olmsted *et al.*, 1986). Les préparations ainsi obtenues contiennent environ 60% de tubuline et 40% de protéines interagissant avec les MTs ou MAPs (Microtubule Associated Proteins). Certaines MAPs ont une action directe sur les MTs : elles peuvent les stabiliser, promouvoir leur assemblage ou au contraire leur dépolymérisation voire leur fragmentation. D'autres protéines agissent sur la dynamique microtubulaire en contrôlant le pool de tubuline libre ou en liant les extrémités positives des MTs telles que les protéines CLIPs, les CLASPs et EB1 (Akhamanova et Steinmetz, 2008). D'autres MAPs sont impliquées dans le transport neuronal, ce sont les moteurs moléculaires dynéine et kinésine.

Dans les neurones, ces différentes MAPs exercent des fonctions spécifiques et complémentaires pour induire un réarrangement du réseau microtubulaire, nécessaire à la maturation neuronale.

I – Les protéines stabilisatrices des MTs

I -1 Les MAPs classiques

Les MAPs classiques ou structurales ont été les premières protéines liant les MTs impliquées dans la régulation de leur dynamique. Elles sont généralement divisées en trois familles : les protéines MAP1, MAP2 et la protéine Tau. D'autres MAPs ont été décrites par la suite, comme par exemple les protéines Doublecortine et STOPs qui sont responsables de fonctions particulières dans la dynamique microtubulaire.

I – 1-1 Les MAPs de types 1 (MAP1)

Chez la plupart des vertébrés, les protéines MAP1 sont au nombre de 3 : MAP1A (380 kDa), MAP1B (330 kDa) et la plus légère MAP1S (120kDa ; Halpain et Dehlmet, 2006). Ces protéines sont codées par des gènes distincts. Chaque protéine de cette famille est synthétisée sous la forme d'un précurseur polypeptidique qui est ensuite clivé, à proximité de l'extrémité carboxy-terminale, en une chaîne lourde (HC) et une chaîne légère (LC) (Figure 11). Les chaînes lourdes et les chaînes légères des protéines MAP1A et MAP1B contiennent un domaine de liaison aux MTs, localisé du côté amino-terminal. Les chaînes légères possèdent, en plus, un site de liaison à l'actine à leur extrémité carboxy-terminale. Les protéines MAP1A et MAP1B sont donc capables de promouvoir l'assemblage de la tubuline, de lier et de stabiliser les MTs lors de leur exposition aux drogues dépolymérisantes (comme le nocodazole) (Bondallaz *et al.*, 2006 ; Hirokawa *et al.*, 1994). Elles peuvent également interagir avec les microfilaments d'actine (Togel *et al.*, 1998 ; Noiges *et al.*, 2002) et faire alors le lien entre ces deux éléments du cytosquelette.

La protéine MAP1S diffère des autres MAP1 : seule sa chaîne légère possède un domaine de liaison aux MTs à son extrémité amino-terminale, différent de celui des chaînes légères des protéines MAP1A et MAP1B (Figure 11). L'interaction de la protéine MAP1S complète n'a pas d'effet sur les MTs, seule la liaison de la chaîne légère stabilise les MTs, en les rendant résistants aux agents dépolymérisants comme la colchicine et le nocodazole (Orban-Nemeth *et al.*, 2005). Elle est également capable de lier les filaments d'actine via son domaine de liaison situé sur la chaîne légère.

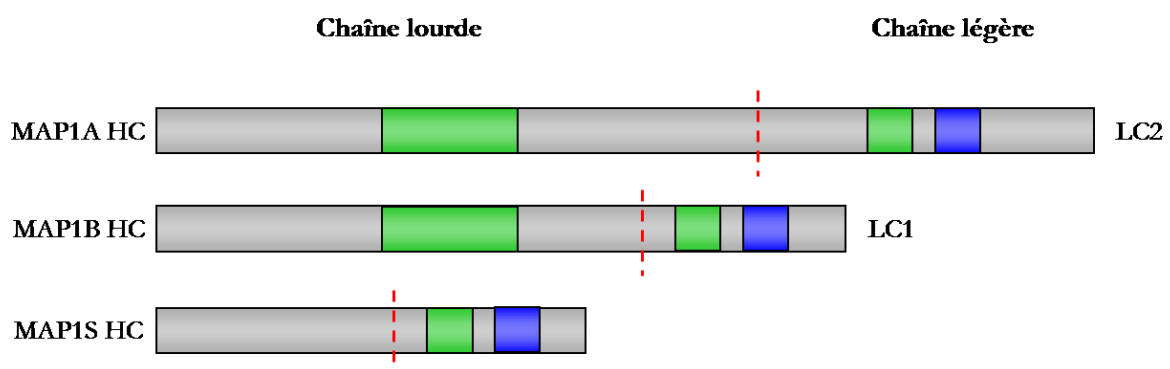


Figure 11: Représentation schématique des protéines MAP1. Les protéines de la famille MAP1 sont au nombre de 3 : MAP1A, MAP1B, MAP1S. Elles sont toutes trois clivées en une chaîne légère (LC) et une chaîne lourde (HC). Elles lient les microtubules et l'actine. ■ : domaine de liaison à l'actine ; ■ : site de liaison aux microtubules ; - - - : site de clivage entre chaîne lourde et chaîne légère.

L'expression des MAP1 est fortement régulée au cours du développement : la protéine MAP1B est exprimée majoritairement au stade précoce du développement neuronal puis son

taux d'expression diminue chez l'adulte. Le profil d'expression de MAP1A est l'inverse de celui de la protéine MAP1B (Tucker *et al.*, 1989 ; Schoenfeld *et al.*, 1989). MAP1S, quand à elle, est une protéine ubiquitaire (les taux d'expression les plus élevés étant dans le cerveau, les testicules, le cœur, le poumon et le foie). Son profil d'expression se rapproche de celui de la protéine MAP1A (Orban-Nemeth *et al.*, 2005).

La protéine MAP1A est fortement exprimée au niveau des dendrites et joue un rôle dans le contrôle de la synaptogénèse ; l'augmentation croissante de sa concentration est concomitante avec l'expansion de l'arborisation dendritique (Szebenyi *et al.*, 2005). La protéine MAP1B est présente dans tous les compartiments neuronaux, elle est retrouvée de manière prépondérante au niveau des axones en développement et de leurs cônes de croissance (Black *et al.*, 1994). Les neurones issus de souris invalidées pour le gène codant pour MAP1B migrent de manière anormale et présentent des défauts de croissance (Gonzales-Billault *et al.*, 2000 ; Edelman *et al.*, 1996). La protéine MAP1B peut être phosphorylée : on observe alors une diminution de la stabilité des MTs (Goold *et al.*, 1999). MAP1B joue donc un rôle essentiel dans la croissance axonale en influençant l'équilibre stabilité / dynamique des microtubules au niveau des cônes de croissance.

I – 1-2 Les MAPs de type 2 (MAP2)

Les protéines de la famille MAP2 sont issues d'un épissage alternatif de l'ARNm transcrit à partir d'un seul gène (Neve *et al.*, 1986). Cette famille est divisée en deux groupes : les MAP2 de haut poids moléculaire (MAP2A et MAP2B ; 280 et 270 kDa respectivement) et les MAP2 de faible poids moléculaire (MAP2C et MAP2D ; 70 et 75 kDa respectivement). La région carboxy-terminale de chacune de ces isoformes contient 3 ou 4 régions répétées de 18 aa, constituant le domaine de liaison aux MTs (Figure 12 ; Lewis *et al.*, 1988). Les protéines MAP2 peuvent lier les MTs et réguler leur dynamique en les stabilisant (Ferhat *et al.*, 1990 ; Kaesh *et al.*, 1996). Cette liaison aux MTs dépend de l'état de phosphorylation des protéines MAP2 : les MAP2 non phosphorylées ou hyper-phosphorylées ne s'associent plus aux MTs (Brugg and Matus, 1991). Le domaine de liaison aux MTs est également impliqué dans l'interaction des MAP2 avec les microfilaments d'actine. Cependant, le rôle de MAP2 dans la liaison du cytosquelette d'actine aux MTs reste à établir (Roger *et al.*, 2004).

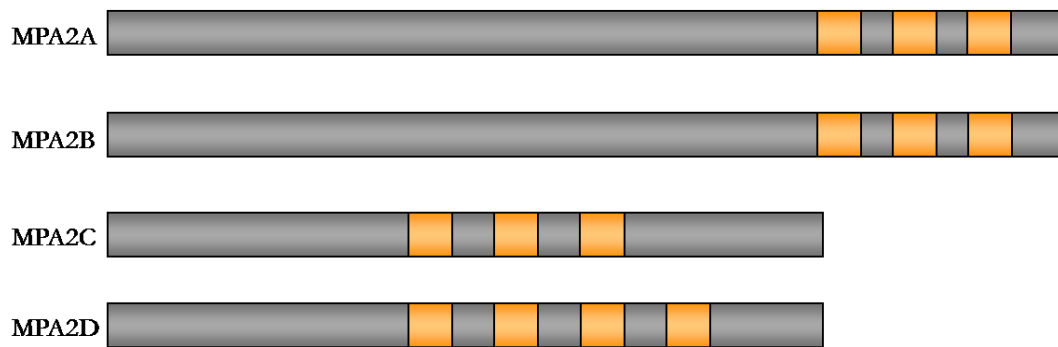


Figure 12 : Organisation moléculaire des principales isoformes de MAP2. Les protéines de la famille MAP2 sont divisées en deux catégories : les protéines MAP2 de haut poids moléculaire (MAP2A et MAP2B) et les protéines de faible poids moléculaires (MAP2C et MAP2D). domaine de liaison aux microtubules.

Les protéines MAP2A et MAP2B sont exclusivement exprimées dans le soma et les dendrites des neurones (Caceres *et al.*, 1984 ; Bernhardt et Matus, 1982). Les protéines MAP2C et MAP2D sont également exprimées dans les neurones mais sont également présentes dans les cellules gliales (Meichsner *et al.*, 1993 ; Doll *et al.*, 1993). MAP2B est exprimée tout au long du développement du système nerveux et persiste à l'âge adulte alors que MAP2A est majoritairement exprimée dans le cerveau adulte (Binder *et al.*, 1984). MAP2C est l'isoforme juvénile des MAP2 : son expression diminue très tôt au cours du développement neuronal (Garner *et al.*, 1988). L'expression de MAP2A augmente quand celle de MAP2C diminue (Chung *et al.*, 1996 ; Figure 14).

L'inhibition de l'expression de MAP2 dans des neurones primaires différenciés, grâce à des oligonucléotides anti-sens, entraîne une diminution du nombre de neurites ainsi qu'une désorganisation du réseau microtubulaire neuritique (Gonzalles-Billault *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 1994). Les protéines MAP2 semblent donc être impliquées dans la morphogénèse neuronale. Cependant, les souris invalidées pour le gène codant pour les protéines MAP2 ne présentent aucune anomalie dans l'organisation du système nerveux central (Teng *et al.*, 2001). Aucun défaut de la polarisation des neurones d'hippocampe de ces souris n'est observé immédiatement après la mise en culture. Mais un raccourcissement des dendrites est remarqué après plusieurs semaines de culture de ces neurones. Les protéines MAP2 semblent donc avoir un rôle spécifique mais pas essentiel dans la morphogénèse neuronale. L'absence des protéines MAP2 dans des neurones en culture et dans l'animal entier n'aboutit pas au même phénotype. Une compensation par d'autres MAPs peut expliquer les différences. En effet, des souris doublement déficientes pour les gènes *map2a* et *map1b* présentent des défauts de la croissance neuronale, plus sévères que ceux observés chez les souris simplement invalidées pour le gène *map1b* (Teng *et al.*, 2001).

I -1-3 La protéine Tau

La protéine Tau existe sous un grand nombre d'isoformes générées par l'épissage alternatif d'ARNm issu d'un seul gène. Les protéines Tau se caractérisent par une région amino-terminale de taille variable en fonction des isoformes, contenant un domaine riche en résidus proline et une région carboxy-terminale portant le domaine de liaison aux MTs (Figure 13). Ce domaine comprend trois (isoforme nommée 3R) ou quatre (isoforme nommée 4R) motifs répétés de 31 ou 32 aa. Ces motifs répétés correspondent à ceux retrouvés dans la séquence de MAP2 (Himmler *et al.*, 1989). Les isoformes 3R et 4R se divisent également en fonction du nombre de domaines riches en prolines situé à l'extrémité amino-terminale : 2 domaines pour Tau 3L et Tau 4L, 1 domaine pour Tau 3S et Tau 4S ou aucun pour Tau 3 ou Tau 4 (Robert *et al.*, 2007 ; Figure 13).

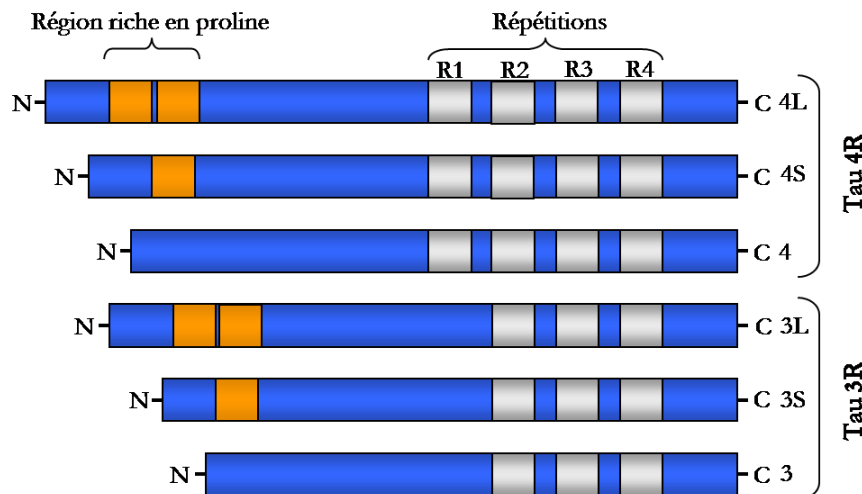


Figure 13 : Représentation schématique des différentes isoformes des protéines Tau. Différentes isoformes de Tau sont exprimées dans le cerveau : des isoformes contenant 3 domaines de liaison aux microtubules (**Tau 3R**) et 4 domaines (**Tau 4R**). Le nombre de domaines riches en prolines localisés au niveau de l'extrémité amino-terminale divise encore les Tau : Tau 4L et Tau 3L contiennent deux domaines riches en proline, Tau 4S et Tau 3S en contiennent un seul et Tau 4 et Tau 3 aucun.

Toutes les isoformes de Tau sont capables de lier les MTs, de les stabiliser et de les protéger contre les catastrophes en favorisant l'assemblage de tubuline à leur extrémité positive (Trinczek *et al.*, 1995). Les isoformes 4R ont une meilleure affinité pour les MTs que les isoformes 3R (Lu and Kosik, 2001). La liaison aux MTs des protéines Tau est fortement régulée par leur état de phosphorylation (Cho *et al.*, 2002). Les Protéines Tau peuvent être phosphorylées soit au niveau de la région riche en proline soit au niveau de leurs domaines de liaison aux MTs (Cho *et al.*, 2003). Leur phosphorylation inhibe leur association avec les MTs (Cho *et al.*, 2003). Dans des cas pathologiques, comme par exemple dans la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau est hyper-phosphorylée et forme des agrégats dans le neurone entraînant une « dystrophie » des

neurites (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986 ; Stoothoff et Johnson, 2005). Les protéines Tau sont également capables de lier les membranes plasmiques via la zone très riche en proline (Brandt *et al.*, 1995 ; Figure 13). Il a récemment été montré que les protéines Tau pourraient être associées aux membranes golgiennes et servir alors de lien entre ces membranes et les MTs (Farah *et al.*, 2006).

Les différentes isoformes de Tau ont une expression variable au cours du développement neuronal : l'isoforme Tau 3 s'exprime au cours du développement embryonnaire alors que les autres isoformes 3R et les isoformes 4R apparaissent à l'âge adulte (Kosik *et al.*, 1989, Figure 14). Au cours du développement neuronal, la phosphorylation des protéines Tau est également régulée : elle diminue avec l'âge (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

Les protéines Tau sont essentiellement localisées dans les axones. Elles semblent jouer un rôle majeur dans la maturation neuronale (Binder *et al.*, 1985). L'inhibition de l'expression des protéines Tau par des oligonucléotides anti-sens entraîne un ralentissement de la croissance axonale dans des cultures primaires de neurones (Caceres et Kosik, 1990). Cependant, l'invalidation du gène *tau* chez la souris, n'entraîne pas une pousse ralentie des axones, excepté au niveau des axones de petits calibres où la proportion de Tau est normalement supérieure par rapport aux autres MAPs (Harada *et al.*, 1994). Des phénomènes compensatoires peuvent expliquer cette absence de défauts. En effet, ces souris présentent une augmentation de l'expression de MAP1A (Dawson *et al.*, 2001). De plus, les souris doublement déficientes pour les protéines Tau et MAP1B ont des défauts plus sévères que les souris simplement déficientes soit pour Tau soit pour MAP1B. Ces résultats mettent clairement en évidence que ces deux protéines ont des fonctions redondantes dans l'organisation des MTs au niveau de la différenciation neuronale (Takei *et al.*, 2000).

Enfin, la protéine Tau se lie aux MTs et organise la polarité neuronale (Kosik et Greenberg, 1994). Sur des cultures primaires de neurones, les neurites se développant au cours des premières heures qui suivent la mise en culture sont indifférenciés et contiennent à la fois la protéine tau et la protéine MAP2. Lorsque les neurones commencent à se polariser, la protéine tau devient prépondérante dans le prolongement qui deviendra l'axone (Kosick et Fish, 1997).

I – 2 La protéine Doublecortine (DCX)

La protéine Doublecortine (DCX, 50 kDa) est une MAP qui contient, au niveau de sa région amino-terminale, deux motifs répétés de 90 aa responsables de sa liaison aux MTs, ces motifs ne présentant aucune homologie de séquence avec les domaines de liaison aux MTs des protéines MAP2 et Tau (Taylor *et al.*, 2000). La protéine DCX stimule la formation de faisceaux

parallèles de MTs, *in vitro* et *in vivo* (Francis *et al.*, 1999 ; Glesson *et al.*, 1999). Elle stabilise également les MTs en inhibant leur dépolymérisation et en favorisant leur nucléation (Moore *et al.*, 2004 et 2006). Comme chez les autres MAPs, la phosphorylation de DCX modifie ses propriétés : inhibition de la liaison aux MTs et de l'effet sur leur polymérisation (Schaar *et al.*, 2004 ; Tanaka *et al.*, 2004).

La protéine DCX est exprimée pendant le développement embryonnaire et se localise dans la partie distale des neurites en croissance des neurones immatures en cours de migration (Schaar *et al.*, 2004 ; Glesson *et al.*, 1999). Ce patron d'expression montre que la protéine DCX joue un rôle central dans la différenciation et la migration neuronale.

Chez l'homme, les mutations de la DCX sont responsables du Syndrome de la Lissencéphalie de type I lié au chromosome X (maladie caractérisée par un retard mental et des crises d'épilepsie sévères). Les principales caractéristiques sont des défauts sévères dans la migration des neurones corticaux (Des Portes *et al.*, 1998). La plupart des mutations mises en évidence dans cette pathologie se situent au niveau du domaine de liaison aux MTs de la protéine DCX (Taylor *et al.*, 2000). De façon surprenante, des souris exprimant des formes mutées de DCX n'ont pas de malformations corticales mais possèdent des anomalies de lamination de l'hippocampe (Corbo *et al.*, 2002 ; Kappeler *et al.*, 2006). Plusieurs explications peuvent nous aider à comprendre pourquoi les mutations de DCX n'ont pas les mêmes conséquences chez l'Homme et chez la souris. La distance de migration des neurones est beaucoup plus importante chez l'Homme que chez la souris, pouvant expliquer la plus grande sensibilité chez l'homme de l'absence de DCX (Kerjan *et al.*, 2007)

I – 3 Les protéines STOPs

Dans les neurones, la majorité des MTs est stable. Ces MTs ont, en effet, la capacité de résister à des conditions dépolymérisantes comme l'exposition au froid ou un traitement à certaines drogues (nocodazole). Les MAPs classiques sont des facteurs responsables de la stabilité des MTs, capables de les protéger de la dépolymérisation induite par le nocodazole. Cependant, elles ne sont pas responsables de leur stabilité au froid même si elles sont présentes en grande quantité (Pirrolet *et al.*, 1983 ; Baas *et al.*, 1994). La recherche des facteurs impliqués dans la stabilité des MTs au froid a permis de mettre en évidence une nouvelle famille de MAPs : les protéines STOPs (Stable Tubule Only Polypeptide). Je décrirai de façon plus détaillée leur structure et leur fonction dans le quatrième paragraphe.

I – 4 Compensations et/ou régulations des protéines stabilisatrices entre elles

Les protéines MAP1B, MAP2 et Tau sont des protéines essentielles dans la stabilisation des MTs, nécessaires au développement neuronal. Chacune de ces protéines a une fonction spécifique à chaque étape du développement neuronal. Elles ne sont pas toutes associées au même moment et en permanence aux MTs neuronaux (Figure 14). Mais elles peuvent avoir des rôles redondants ou coopératifs ainsi qu'en association avec les protéines DCX et STOP.

Alors que l'inhibition de Tau dans les neurones empêche l'élongation neuritique, les souris déficientes en protéine Tau ne présentent aucun défaut. Une augmentation de la protéine MAP1A est observée chez ces souris (Harada *et al.*, 1994 ; Dawson *et al.*, 2001) et pourrait expliquer le phénotype observé. Les souris doublement déficientes en MAPs classiques ont des défauts plus sévères que les souris simplement déficientes, expliquant que l'activité des différentes MAPs semble pouvoir se compenser (Di Tella *et al.*, 1996 ; Teng *et al.*, 2001, Takei *et al.*, 2000).

La protéine DCX coopère avec MAP2 pour stabiliser les MTs pendant la formation des neurites, en ayant des activités différentes. La protéine MAP2 semble augmenter la stabilité des MTs pour permettre la formation des neurites alors que DCX semble induire la formation de faisceaux de MTs, contrôlant la segmentation du lamellipodes pour permettre la formation des filopodes. L'inhibition de MAP2 empêche la naissance des neurites alors que la déplétion de DCX dans les neurones corticaux augmente le nombre de neurites (Bielas *et al.*, 2007).

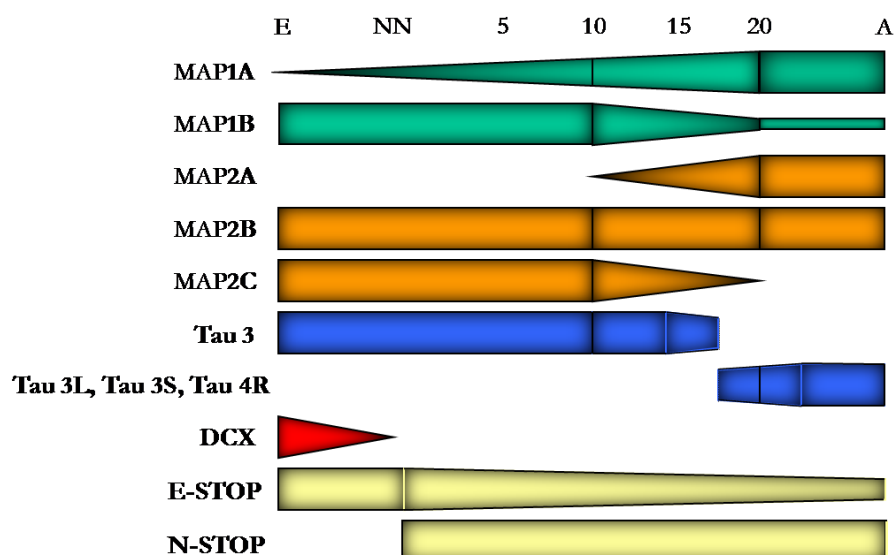


Figure 14 : Représentation schématique du changement d'expression des principales MAPs neuronales au cours du développement du cerveau de rat. E : embryon ; NN : Nouveau-né ; 5 à 20 : nombre de jours après la naissance ; A : adulte. Les changements les plus importants sont observés entre 10 et 20 jours.

La coopération de ces différentes MAPs est clairement nécessaire au cours du développement neuronal (Figure 14).

II – Les protéines régulatrices de la polymérisation des microtubules neuronaux

La dynamique des MTs peut être régulée d'une part par des protéines capables de lier directement les MTs et ainsi agir sur leur polymérisation ou leur dépolymérisation (paragraphe I). Elle peut être d'autre part être contrôlée par une régulation du pool de tubuline libre. Des protéines sont capables de séquestrer ou de dissocier les dimères de tubuline, présents dans le cytoplasme.

II – 1 La famille stathmine

La protéine Stathmine est une phospho-protéine cytosolique, initialement décrite, comme un relais intégrant diverses voies de signalisation intracellulaire (Sobel *et al.*, 1991). Cette protéine appartient à une famille de protéines qui se divise en 3 groupes : le premier est constitué uniquement de la protéine Stathmine, protéine de référence contenant le domaine minimal partagé par tous les membres (domaine Stathmine like ou SLD ; Figure 15) ; le deuxième groupe contient la protéine SCG10 (Superior Cervical Ganglion Clone 10 ; marqueur de la différenciation neuronale), la protéine SCLIP (SCG10-Like-Protein apparentée à la protéine SCG10) et enfin le troisième groupe, la protéine RB3 et ses variants RB3' et RB3'' (Ozon *et al.*, 1998). Les protéines appartenant à la famille de la stathmine (protéines du groupe 2 et 3) possèdent une organisation moléculaire très similaire (Figure 15) : le domaine SLD et un domaine amino-terminal, de taille variable suivant les membres. Ce domaine se divise en 3 sous-domaines : un domaine A très conservé entre les différents membre de la famille et qui permet aux protéines de se localiser au niveau des membranes ; les autres sous-domaines A' et A'' sont spécifiques des variants RB3, RB3' et RB3'' et leurs fonctions s'expriment uniquement lorsque le domaine A est absent (Di Paolo *et al.*, 1998 ; Chauvin *et al.*, 2008). La partie amino-terminale de la protéine Stathmine contient 4 sites de phosphorylation (résidus sérine) (Beretta *et al.*, 1994). La protéine SCG10 possèdent les mêmes sites de phosphorylation (Antonsson *et al.*, 1997). La phosphorylation des autres membres de la famille est connue avec moins de précisions (Tararuk *et al.*, 2006 ; Ozon *et al.*, 1997). La phosphorylation des protéines de la famille de la stathmine diminue leur affinité pour la tubuline et donc leur capacité à inhiber la polymérisation des MTs (Curmi *et al.*, 1999 ; Steinmetz, 2007).

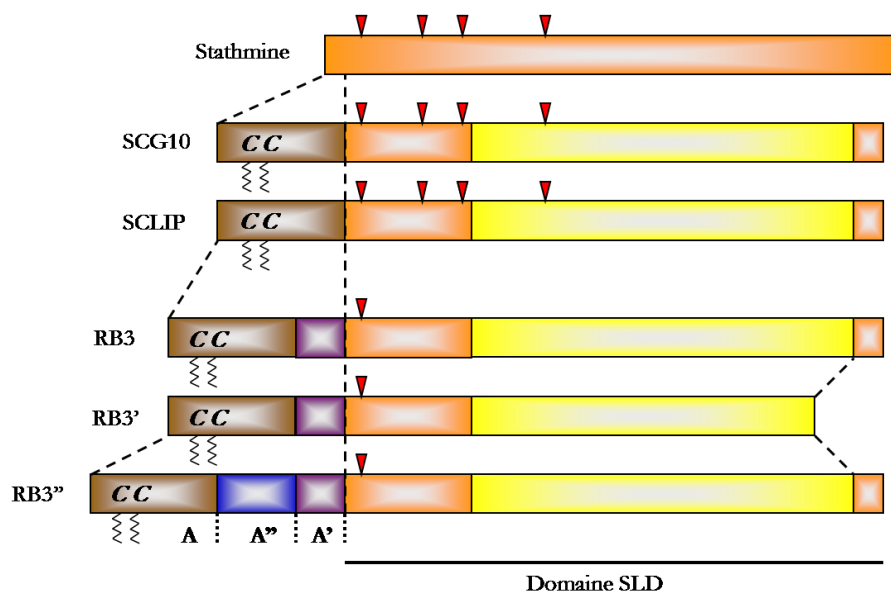


Figure 15 : Organisation moléculaire des protéines de la famille Stathmine. Les protéines apparentées à la stathmine (SCG10, SCLIP, RB3, RB3' et RB3'') partagent un domaine SLD (Stathmin like domain) et une extension amino-terminale ou domaine A où se situent deux résidus Cystéines (C) palmitoylés (ξ). Les domaines A' et A'' sont spécifiques de RB3, RB3' et RB3''. Les flèches rouges représentent les sites de phosphorylation de la Stathmine et des autres membres de la famille stathmine.

Ces protéines sont capable d'interagir avec les hétérodimères de tubuline par l'intermédiaire de leur domaine SLD et de les séquestrer, diminuant alors la quantité de tubuline libre. Elles régulent ainsi la dynamique des MTs, en diminuant l'association de dimères de tubuline à leurs extrémités (Curmi *et al.*, 1997 ; Jourdain *et al.*, 1997 ; Charbaut *et al.*, 2001). La transfection d'ADNc de protéines de la famille des stathmines dans les cellules en culture déstabilise fortement le réseau microtubulaire (Gavet *et al.*, 1998). Il est également proposé par certains groupes que ces protéines peuvent promouvoir les catastrophes des MTs (Howell *et al.*, 1999a et b ; Larsson *et al.*, 1999) en agissant directement sur leurs extrémités. La stathmine semble capable d'interagir avec les MTs mais une telle association n'a jamais été observé *in vivo* (Manna *et al.*, 2006).

La protéine Stathmine est protéine ubiquitaire avec une forte expression au niveau du système nerveux. Les autres membres de la famille sont principalement exprimés au niveau du système nerveux (Biech *et al.*, 2003). Les protéines Stathmine et SCG10 ont un pic d'expression au moment de la naissance. Les protéines SCLIP et RB3 sont, quant à elles, faiblement exprimées au cours du développement embryonnaire, mais leur taux d'expression reste constant à l'âge adulte (Ozon *et al.*, 1999).

Dans les neurones, la protéine stathmine est cytosolique alors que les autres membres de la famille sont localisés au niveau de l'appareil de Golgi, de structures vésiculaires présentes dans

le soma et dans les neurites, et au niveau du cône de croissance (Di Paolo *et al.*, 1997 ; Gavet *et al.*, 1998 et 2002). Cette localisation proche des membranes dépend du domaine A amino-terminal. En effet, une délétion de ce domaine de SCG10 abolit son accumulation au niveau du golgi et du cône de croissance et entraîne sa solubilisation (Di Paolo *et al.*, 1997 ; Lutjens *et al.*, 2000). Ce domaine A possède deux cystéines qui peuvent être palmitoylées [cette modification sera décrite au chapitre 3 (Chauvin *et al.*, 2008 ; Figure 15)]. Les domaines A' et A'' situés en aval du domaine A des protéines RB3, RB3' et RB3'' pourraient expliquer leurs différentes fonctionnalités. Par exemple, même si SCG10 et SCLIP ont une localisation similaire, SCLIP est impliqué dans le contrôle du branchement axonal alors que SCG10 est importante pour l'expansion du cône de croissance (Poulain *et al.*, 2007)

La stathmine joue un rôle important dans la migration et dans la morphogénèse neuronale. SCG10 exerce un rôle dans le contrôle de la différenciation neuronale (Riederer *et al.*, 1997 ; Morii *et al.*, 2006 ; Suh *et al.*, 2004). La protéine SCLIP est importante dans le branchement axonal (Poulain *et al.*, 2007). L'invalidation du gène codant pour la stathmine chez la souris entraîne le développement, avec l'âge, d'une axonopathie mettant en avant un rôle important de la stathmine dans l'intégrité du système nerveux (Liedtke *et al.*, 2002).

II – 2 La tubuline-Cofacteur B (TBCB)

Cette protéine TBCB (Tubulin cofactor B) a récemment été mise en évidence. C'est une protéine ubiquitaire, nécessaire au bon repliement de la tubuline et à la formation de l'hétérodimère de tubuline $\alpha\beta$ (Tian *et al.*, 1996). En se liant au cofacteur E, impliqué dans la dissociation de l'hétérodimère de tubuline, elle régule la dynamique microtubulaire (Kortazar *et al.*, 2006). Sa liaison au cofacteur E augmente la capacité de ce dernier à dissocier l'hétérodimère de tubuline, entraînant alors la dépolymérisation du MT.

La protéine TBCB est principalement exprimée pendant la neurogénèse dans le cerveau en développement. Elle s'accumule au niveau des extrémités de neurones en croissance au cours des premiers stades de différenciation, plus particulièrement au niveau de la zone de transition du cône de croissance. Par contre, elle est uniformément distribuée à travers l'axone et les dendrites dans les neurones matures, suggérant un rôle au niveau de la différenciation neuronale précoce (Lopez-Fanarraga *et al.*, 2007). Elle défavorise la croissance axonale en stimulant la dissociation des hétérodimères de tubuline dans le cône de croissance via son interaction avec le cofacteur E (Lopez-Fanarraga *et al.*, 2007).

III – Les protéines de « bouts plus » des microtubules

Contrairement aux MAPs classiques qui se localisent le long des MTs, un nombre croissant de protéines se retrouvent à l'extrémité positive des MTs. Si les MTs seuls peuvent chercher leur cible dans l'espace intracellulaire et contacter les différentes membranes et organelles, les protéines des extrémités positives semblent être les meilleures candidates pour faire ce lien. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux protéines CLIPs (Cytoplasmic Linker Proteins), CLASPs (CLIP-associated proteins) et EBs (End Binding Proteins)

III – 1 Les protéines CLIPs

III – 1 – 1 CLIP-170

La protéine CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Proteins of 170 kDa) a été identifiée comme une protéine liant spécifiquement les organelles aux MTs (Pierre *et al.*, 1992). Schématiquement, elle est composée (Figure 16) :

- d'une région amino-terminale contenant deux domaines CAP-Gly (Cytoskeletal Associated Protein Glycine rich), responsables de sa liaison aux MTs (Pierre *et al.*, 1992). Notre équipe a montré que via cette région amino-terminale, les protéines CLIPs et d'autres protéines contenant des domaines CAP-Gly, interagissent préférentiellement avec les MTs tyrosinés (Badin-Larcon *et al.*, 2004 ; Peris *et al.*, 2006). Cette région est aussi responsable de l'interaction de CLIP-170 avec d'autres protéines de bouts plus comme les protéines EB, IQGAP et CLASPs (Figure 16).
- d'un domaine central en hélices α sur-enroulées, qui lui permet de former des dimères parallèles (Scheel *et al.*, 1999).
- d'une région carboxy-terminale, contenant des motifs en doigt de zinc. Ce dernier domaine est le domaine cargo liant les vésicules endocytaires (Pierre *et al.*, 1992). Les domaines en doigt de zinc interagissent avec la région amino-terminale, lui permettant alors de se replier sur elle-même et de réguler de cette façon la liaison aux MTs (Lansbergen *et al.*, 2004).

Dans les cellules, CLIP-170 s'associe en forme de comète aux extrémités positives des MTs en croissance (Perez *et al.*, 1999). L'association spécifique de CLIP-170 aux extrémités positives des MTs n'est pas encore très bien comprise. Plusieurs mécanismes expliqueraient cette association : CLIP-170 pourrait reconnaître et lier spécifiquement une conformation particulière des MTs en croissance ou nécessiterait la présence de tubuline-GTP aux extrémités des MTs ;

CLIP-170 pourrait se localiser aux extrémités positives des MTs par son association à un intermédiaire ou CLIP-170 pourrait être transportée et déposée aux extrémités positives par un moteur moléculaire. Différents arguments permettent de penser que ces mécanismes pourraient co-exister et que l'importance de chacun change selon le modèle cellulaire analysé. Quelques groupes de recherche ont suggéré que la protéine CLIP-170 se lie avec une forte affinité aux MTs récemment polymérisés, qu'elle se déplace par « treadmilling » et qu'elle se dissocie par une perte d'affinité pour la paroi du MT (Folker *et al.*, 2005, Komarova *et al.*, 2005). D'autres groupes ont suggéré que CLIP-170 co-polymérise avec la tubuline (Perez *et al.*, 1999 ; Arnal *et al.*, 2004 ; Diamantopoulos *et al.*, 1999). Bien que les homologues de CLIP-170 chez la levure, Bik1p chez *S. cerevisiae* et Tip1p chez *S. pombe*, soient transportés aux bouts plus des MTs par un moteur moléculaire de la famille des kinésines, ce mécanisme n'a pas été prouvé dans les cellules de Mammifères (Busch *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004). Le domaine de liaison aux MTs de CLIP-170 est capable d'interagir avec l'extrémité carboxy-terminale de la tubuline α , comme avec EB1 (Honnappa *et al.*, 2006). CLIP-170 ne reconnaît pas les extrémités des MTs détyrosinés dans les cellules en culture, montrant que la tyrosine carboxy-terminale est nécessaire à l'accumulation de CLIP-170 aux bouts plus des MTs et qu'EB1 n'est pas suffisante (Peris *et al.*, 2006). Pourtant, il a également été montré qu'EB1 joue un rôle clé dans la localisation de CLIP-170 (Komarova *et al.*, 2005). Niels Galjart et ses collaborateurs viennent de montrer que la polymérisation des MTs génère un grand nombre de site de liaison à CLIP-170 qui décroît rapidement. Ceci met en avant un décrochage rapide de CLIP-170 des bouts plus des MTs (Dragestein *et al.*, 2008).

La localisation aux extrémités positives des MTs fait agir CLIP-170 comme un régulateur de la dynamique des MTs. Le domaine amino-terminal de CLIP-170 a été décrit comme un facteur de sauvetage des MTs. Cette propriété a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* (Arnal *et al.*, 2004 ; Komarova *et al.*, 2002). CLIP-170 est également importante pour faire le lien entre les extrémités positives des MTs et leurs différentes cibles. D'ailleurs, le premier rôle décrit pour CLIP-170 était de faire le lien entre les vésicules d'endocytose et les MTs (Pierre *et al.*, 1992). La capture des MTs au front de migration de la cellule fait intervenir CLIP-170 : d'une part, via son interaction avec les protéines CLASPs (voir paragraphe III-2) et aussi par l'intermédiaire de la protéine IQGAP1, une protéine d'union à la calmoduline qui active l'activité ATPase des petites protéines G. IQGAP1 lie CLIP-170, des protéines d'adhésion cellulaire et aussi les formes actives des petites protéines G, Cdc42 et Rac1. De cette façon, la capture des MTs via CLIP-170 et IQGAP1 régule la communication entre MTs et actine, la dynamique locale des microfilaments et l'adhésion cellulaire (Fukata *et al.*, 2002 ; Figure 19).

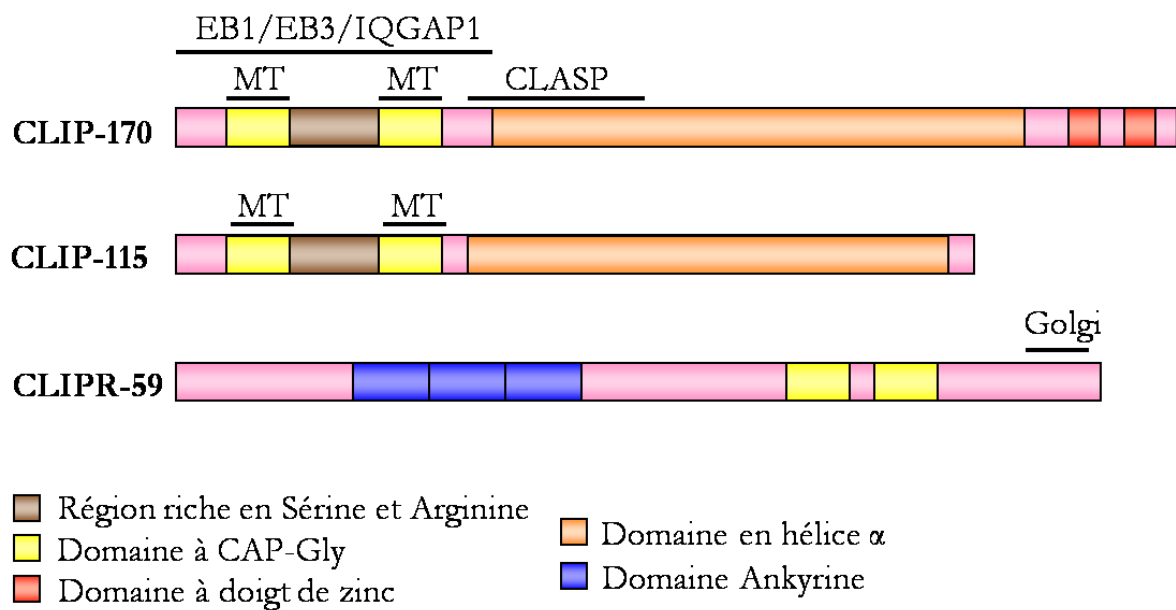


Figure 16 : Structure des CLIPs. Représentation schématique de CLIP-170, de CLIP-115 et de CLIP-59. La protéine CLIP-170 interagit avec les protéines EB-1 et EB-3 et avec la protéine IQGAP1 au niveau de sa région amino-terminal. Elle s'associe aussi avec les protéines CLASPs au niveau de sa région central.

Les protéines CLIPs ont un rôle important dans le développement cérébral et l'organisation neuronale. L'étude du modèle animal déficient en Tubuline Tyrosine Ligase (TTL), l'enzyme qui ajoute un résidu tyrosine C-terminale à la tubuline détyrosinée, a révélé des nombreuses altérations morphologiques au niveau cérébral, ainsi qu'une croissance neuritique accélérée dans des neurones en culture. Ces défauts sont liés à une délocalisation des protéines contenant des domaines CAP-Gly (comme par exemple la protéine CLIP-170) sur des MTs détyrosinés (Erck *et al.*, 2005). L'étude du modèle animal déficient en CLIP-170 n'a pas révélé des défauts neuronaux majeurs, probablement à cause de la compensation des autres protéines de la famille CLIPs (Akhmanova *et al.*, 2005).

III – 1 – 2 Les autres CLIPs

*La protéine **CLIP-115** (Cytoplasmic Linker Proteins of 115 kDa) a une structure similaire à celle de CLIP-170 mais ne possède pas de motifs en doigts de zinc au niveau de son extrémité carboxy-terminale (De Zeeuw *et al.*, 1997 ; Figure 16). CLIP-115 est exprimée majoritairement dans le cerveau. Elle se localise au niveau des dendrites de la plupart des neurones, où elle fait le lien entre les extrémités positives des MTs et des vésicules telles que les corps lamellaires dendritiques (DLB ; De Zeeuw *et al.*, 1997 ; Hoogenraad *et al.*, 2000) qui n'ont pas encore de fonction déterminée.

La localisation aux extrémités positives des MTs des protéines CLIP-115 peut lui conférer un rôle dans la dynamique microtubulaire et donc être indirectement impliquée dans la morphogénèse neuronale, même si aucune étude n'a permis pour le moment de le confirmer. Le gène codant pour CLIP-115 (CYLN2, cytoplasmic linker protein gene 2) est localisé dans une région de susceptibilité au Syndrome de Williams (Hoogstraad *et al.*, 1998). Le Syndrome de Williams est lié à l'association d'un retard mental, d'une cardiopathie et d'un comportement caractéristique (grande sociabilité, pas de réponse de peur). L'analyse des souris déficientes en protéines CLIP-115 montre que l'absence de CLIP-115 pourrait expliquer certains défauts neuronaux observés, tels que l'augmentation du volume des ventricules cérébraux et les défauts d'apprentissage liés à un dysfonctionnement de l'hippocampe (réduction de la LTP ; Hoogstraad *et al.*, 2004).

*La protéine **CLIPR-59** (CLIP-170 related protein of 59 kDa) contient deux domaines CAP-Gly dans la région amino-terminale mais elle n'a pas de domaine en hélices sur-enroulées ou de motifs en doigt de zinc (Perez *et al.*, 2002). En outre, elle contient trois répétitions ankryrine (Figure 16). Cette protéine s'associe au réseau trans-Golgien mais n'est pas retrouvée au bout plus des microtubules. CLIPR-59 est palmitoylée et cette modification lui permet de s'ancrer au niveau des rafts lipidiques (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2004). La protéine CLIPR-59 inhibe la polymérisation des MTs, à proximité de ces rafts.

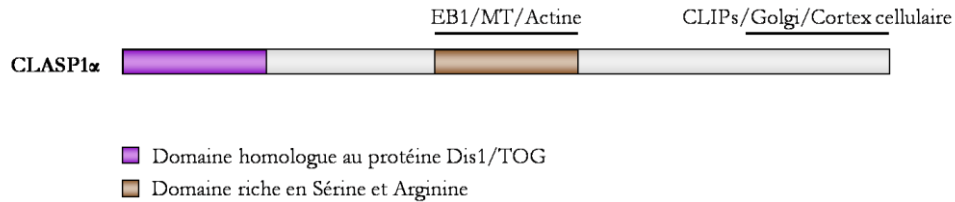
III – 2 Les CLASPs

Les protéines CLASPs (CLIP-associated proteins) ont été identifiées dans un crible double-hybride avec la région en hélices super-enroulées de CLIP-115 (Akhmanova *et al.*, 2001). Les CLASPs sont divisées en deux sous-familles : les CLASP-1 ubiquitaires et les CLASP-2 particulièrement abondantes dans le cerveau. Chaque sous-famille contient des isoformes α et β . Elles sont composées :

- d'un domaine de liaison aux protéines CLIPs au niveau de leur extrémité carboxy-terminale
- d'une région centrale composée de domaines répétitifs riche en résidus sérine, arginine et proline impliquées dans la liaison aux MTs. Cette région est la cible de différentes protéines kinases, comme la Glycogen Synthase Kinase 3 qui régule la liaison de CLASPs aux MTs.
- d'un domaine amino-terminal qui diffère. Les isoformes α des protéines CLASP-1 et CLASP-2 ont un domaine amino-terminal similaire à une région des protéines

Dis1/TOG, protéines associées aux MTs (Figure 17A). Le domaine amino-terminal de CLASP-2 β contient, quant à lui, deux cystéines palmitoylées responsables de sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi.

A



B

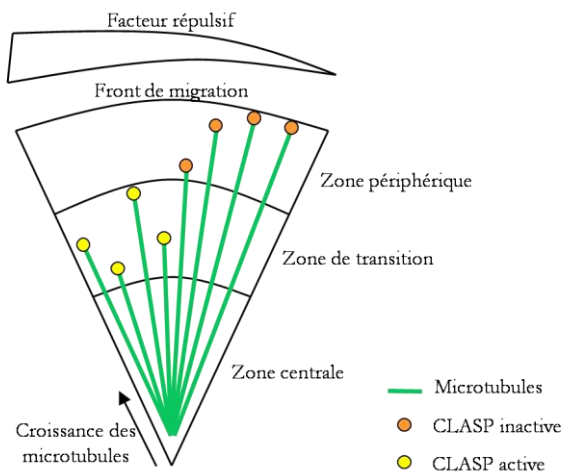


Figure 17 : Les CLASPs. A/ Représentation schématique de la protéine CLASP-1 α et localisation de leur interaction avec ses partenaires. **B/** Modèle expliquant la régulation de la croissance du cône de croissance par les CLASPs, en réponse à des facteurs répulsifs.

De façon similaire aux protéines CLIPs, les CLASPs peuvent lier et stabiliser les MTs (Akhmanova *et al.*, 2001). Elles s'associent en formant des comètes aux bouts plus des MTs. A proximité du front de migration cellulaire, les protéines CLASPs ne forment plus de comète mais interagissent avec le corps du MT, comme les MAPs. Cette régulation de la localisation de CLASPs est dépendante de l'activité de GSK3 β et de Rac1 (Wittman *et al.*, 2005). Enfin, les CLASPs retiennent les MTs au niveau de ce front de migration par l'intermédiaire d'un complexe moléculaire contenant la protéine LL5 β (Lansbergen *et al.*, 2006).

Les CLASPs s'associent également à l'appareil de Golgi, où elles régulent la nucléation des MTs au niveau des membranes golgiennes. De cette manière, elles contribuent au maintien d'un

réseau microtubulaire polarisé et contrôlent le transport post-golgien vers le front de migration cellulaire (Efimov *et al.*, 2007).

Les protéines CLASPs lient également l'actine β , *in vitro* (Tsvetkov *et al.*, 2007). Le domaine d'interaction se localise au niveau du domaine de liaison au MTs de la région centrale mais également au niveau de la région amino-terminale pour les isorformes α des deux sous familles. Elles colocalisent avec les faisceaux d'actine, présents au niveau des cônes de croissance axonale (Tsvetkov *et al.*, 2007). De cette façon, elles servent de liens entre le réseau microtubulaire et le réseau d'actine au sein du cône de croissance : elles contrôlent la dynamique des MTs lors de la formation des filopodes et elles réorganisent le réseau d'actine, essentiel à la migration du cône de croissance (Schober *et al.*, 2007).

La protéine Orbit/Mast (homologue des CLASPs chez *Drosophila Melanogaster*) est impliquée dans les phénomènes de polarisation et notamment dans la guidance des cônes de croissance axonaux (Lee *et al.*, 2004). Contrairement aux CLIPs, les CLASPs sont fortement concentrées au niveau des cônes de croissance. La surexpression de CLASPs dans des neurones en culture supprime la croissance des MTs au niveau du front de migration des cône de croissance et les contraint à former des boucles dans le domaine central du cône, ralentissant alors son avancée (Lee *et al.*, 2004). En réponse à des facteurs de répulsion, les CLASPs sont activées, inhibant la polymérisation des MTs. Cette propriété empêche le front de migration d'avancer et permet alors au cône de croissance de contourner les facteurs répulsifs (Figure 17 B).

III – 3 La famille d'EB1

La protéine EB1 (End Binding 1) a été identifiée en recherchant les partenaires de la partie carboxy-terminale d'APC (Adenomatous Polyposis Coli), protéine impliquée dans les formes familiales et sporadiques des carcinomes coliques (Su *et al.*, 1995 ; Kinzler et Vogelstein, 1996). EB1 est une protéine très conservée au cours de l'évolution. Chez l'Homme, il existe au moins EB1, EB2, EB3 et EB3F ainsi que des protéines similaires RP1, RP2 et RP3. Les protéines EB1 et EB2 ont une distribution ubiquitaire, alors qu'EB3 est exprimée préférentiellement dans le système nerveux (Nakagawa *et al.*, 2000).

Les différents membres de la famille EB1 possèdent :

- un domaine amino-terminal homologue à la calponine, nécessaire à leur interaction directe avec les MTs (Hayashi et Ikura, 2003 ; Figure 18).

- une région centrale de type « coiled-coiled », impliquée dans leur dimérisation et dans l'interaction avec d'autres protéines telles qu'APC
- une queue carboxy-terminale acide, similaire au C-terminus de la tubuline α , qui est importante pour l'interaction avec les protéines CLIPs et CLASPs (Slep *et al.*, 2005 ; Komarova *et al.*, 2005 ; Figure18).

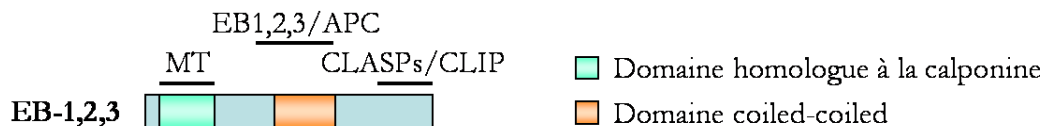


Figure 18 : Représentation schématique d'EB1. La structure et les domaines d'interactions avec les différents partenaires des protéines de la famille EB sont indiqués.

La protéine EB1 s'associe aux extrémités positives des MTs en formant des comètes, comme CLIP-170 (Berrueta *et al.*, 1998 ; Nakamura *et al.*, 2001). C'est une protéine clé des complexes des bouts plus des MTs en croissance, grâce à son interaction avec la plupart des autres protéines de bouts plus (Lansbergen et Akhmanova, 2006). Elle joue un rôle dans la régulation de la dynamique microtubulaire et notamment dans la stabilité des MTs, en augmentant le nombre de sauvetage ainsi que le temps de polymérisation des MTs (Tirnauer *et al.*, 2002). Comme CLIP-170, les protéines EB se replient sur elles-mêmes, la liaison avec leurs partenaires au niveau de leur extrémité carboxy-terminale entraîne un changement de conformation qui leur permet alors de lier les MTs (Morrison *et al.*, 2007). Elles sont également essentielles dans la capture des MTs au niveau du front de migration des cellules (Lansbergen et Akhmanova, 2006).

Le rôle des protéines de la famille d'EB1 dans la différenciation neuronale commence à être étudié. Chaque membre semble avoir des rôles spécifiques dans le contrôle de la morphogénèse neuronale : la surexpression d'EB2 bloque l'élongation neuritique induite par le NGF dans les cellules PC12, EB3 augmente le nombre de neurites des cellules PC12 alors qu'EB1 n'a aucun effet (Laketa *et al.*, 2007). Cependant, dans des neurones déficients en protéine MAP1B qui présentent des défauts de croissance neuritique, la surexpression d'EB1 restaure le phénotype cellulaire laissant imaginer que les protéines de la famille d'EB1 pourraient compenser les fonctions des MAPs stabilisatrices au cours du développement (Jimenez-Mateos *et al.*, 2005).

III – 4 Le bout plus des MTs

Comme nous venons de le voir, les protéines de bouts plus forment un complexe protéique aux extrémités positives des MTs. Elles interagissent entre elles et avec différents composants subcellulaires, comme la membrane plasmique, les vésicules, l'actine, le Golgi, etc (Figure 19). Grâce à ces différentes interactions, elles jouent un rôle essentiel dans le développement neuronal (migration neuronale, croissance et guidage axonaux). La communication entre des neurones différenciés dépend également des protéines de bout plus, par l'intermédiaire de leurs rôle dans le positionnement des organites, des récepteurs et des canaux.

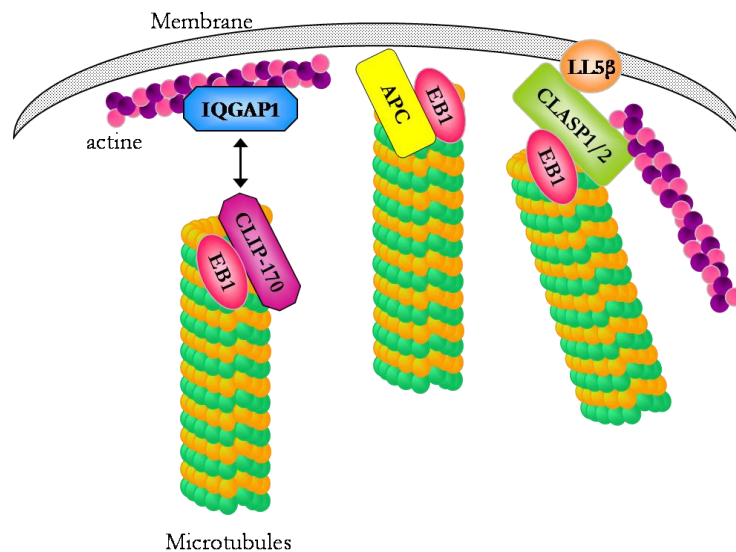


Figure 19 : Modèle de l'attachement des microtubules à la membrane par CLIPs, CLASPs et EB1. Les CLASPs interagissent avec les MTs en croissance et sont aussi en contact avec la membrane par leur association avec LL5β. IQGAP1 lie les petites protéines G activées qui lui permet de lier l'actine. IQGAP1 recrute ensuite les bouts plus des MTs par l'intermédiaire de CLIP-170. D'après Lansbergen *et al.*, 2006.

IV – Les moteurs moléculaires

Les moteurs moléculaires ou MAPs motrices permettent d'acheminer, le long des MTs des composants tels que des vésicules, des mitochondries à des endroits précis de la cellule. Dans les neurones, ces moteurs ont un rôle essentiel. Par exemple, la synthèse des neurotransmetteurs se réalisent uniquement au niveau du corps cellulaire, il est important qu'ils soient transportés au niveau de la terminaison pré-synaptique par l'intermédiaire de ces moteurs.

IV – 1 Les kinésines

La kinésine-1 conventionnelle est une protéine tétramérique composée de deux chaînes légères et deux chaînes lourdes. Les chaînes lourdes sont composées, le plus souvent, d'une tête globulaire contenant le domaine moteur et le domaine de liaison aux MTs, d'un cou, d'une tige et

d'une queue sur laquelle se lie le cargo qu'elles transportent. Elle est responsable du transport antérograde c'est-à-dire du transport se réalisant vers l'extrémité positive des MTs. Le mouvement de la kinésine-1 est possible grâce à l'hydrolyse d'ATP qui entraîne un changement conformationnel de la protéine (Hirokawa *et al.*, 1991).

Un grand nombre de protéines appartenant à la famille de la kinésine-1 a été mis en évidence : les protéines KIFs (Kinesine Family, Miki *et al.*, 2005). Elles participent aux transports d'organites, de complexes protéiques ou d'ARN messagers. Quelques kinésines sont capables de dépolymériser les MTs, comme par exemple les protéines MCAKs (Mitotic Centromere associated kinesine 2 ou KIF2). La protéine KIF2A a été la première kinésine dépolymérisante à être clonée. Les neurones primaires de souris invalidée pour le gène *kif2a* présentent des axones avec de nombreuses branches collatérales (Homma *et al.*, 2003). La suppression des branches collatérales réalisées après que le neurite primaire ait atteint sa cible n'est pas réalisée. Les facteurs dépolymérisant tels que MCAK jouent un rôle important dans l'établissement d'un circuit neuronal fonctionnel.

IV – 2 La dynéine

La dynéine est un complexe multi-protéique, constitué de 2 chaînes lourdes, 2 chaînes intermédiaires, 4 chaînes intermédiaires légères et de plusieurs chaînes légères (Vallee *et al.*, 2004). Les chaînes lourdes contiennent six domaines AAA, responsables de l'hydrolyse de l'ATP, nécessaire au mouvement du moteur moléculaire. Le rôle respectif de chacune des autres chaînes n'est pas forcément bien défini. Toutefois, les chaînes intermédiaires ainsi qu'une des chaînes légères (Tctex1) participent à l'interaction du moteur avec les organites à déplacer (Steffen *et al.*, 1997 ; Nagano *et al.*, 1998)). La dynéine est impliquée dans le transport rétrograde d'organites et de vésicules dans les neurones (Mok *et al.*, 2001 ; Di Bella *et al.*, 2001). Elle joue également un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi et sa localisation (Burkhardt *et al.*, 1997).

Ces moteurs moléculaires sont en compétition avec les MAPs : en se liant aux MTs, les MAPs bloquent l'accès aux moteurs. Une régulation peut alors avoir lieu entre ces deux classes de protéines. Citons l'exemple de Tau : en présence d'une faible quantité de Tau (au niveau du soma), la kinésine peut se fixer aux MTs alors qu'à forte concentration (au niveau du cône de croissance), Tau empêche la liaison de la kinésine (Dixit *et al.*, 2008). Ceci pourrait expliquer le phénomène de neurodégénérescence observé lors de l'agrégation de Tau dans des cas pathologiques tels que la maladie d'Alzheimer.

V – Les protéines STOPS

Les protéines STOPS (Stable Tubule Only Polypeptide) sont des protéines associées aux MTs, isolées à partir de préparations de microtubules de cerveaux de rat (Job *et al.*, 1981). Les protéines STOPS ont été initialement décrites comme étant responsables de la stabilité au froid des MTs neuronaux (Bosc *et al.*, 1996 ; Guillaud *et al.*, 1998).

V – 1 Les différentes isoformes des protéines STOPS

Le gène *stop* est localisé sur le chromosome 1q32 chez le rat, 7E2-F1 chez la souris et 11q14 chez l'homme (Denarier *et al.*, 1998a). Il est composé de quatre exons (Figure 20). L'exon 1 code pour la région amino-terminale des protéines et la région répétée centrale. Cette région est composée de cinq répétitions d'une séquence de 46 aa. Le nombre de répétitions centrales varie entre et au sein des différentes espèces : un seul motif central est présent chez l'homme, 4 ou 5 chez la souris et 4 à 6 chez le rat. L'exon 2 et l'exon 3 codent, respectivement, pour le domaine « Linker » et le domaine basique, riche en lysine et arginine (KR). L'exon 4 code pour la région répétée carboxy-terminale, constituée de 28 répétitions imparfaites d'une séquence de 11 aa.

V – 1-1 Les isoformes spécifiques des neurones

Deux isoformes exprimées spécifiquement dans les cellules neuronales ont été caractérisées chez le rat : une isoforme précoce ou E-STOP (Early-STOP) et une isoforme adulte ou N-STOP (Bosc *et al.*, 1996 ; Guillaud *et al.*, 1998).

La protéine N-STOP est constituée de 952 aa soit un poids moléculaire apparent de 145 kDa. Son ARNm est constitué des transcrits des quatre exons du gène, décrits précédemment (Figure 20).

L'isoforme E-STOP a un poids moléculaire apparent de 84 kDa chez le rat (Guillaud *et al.*, 1998). L'ARNm E-STOP est dépourvu de l'exon 4 (Figure 20). Cette isoforme ne contient donc pas le domaine C-terminal répété. Les ARNm des isoformes N- et E-STOP sont transcrits à partir d'un même promoteur. La synthèse des protéines correspondantes résulte d'un épissage alternatif (Aguezzoul *et al.*, 2003).

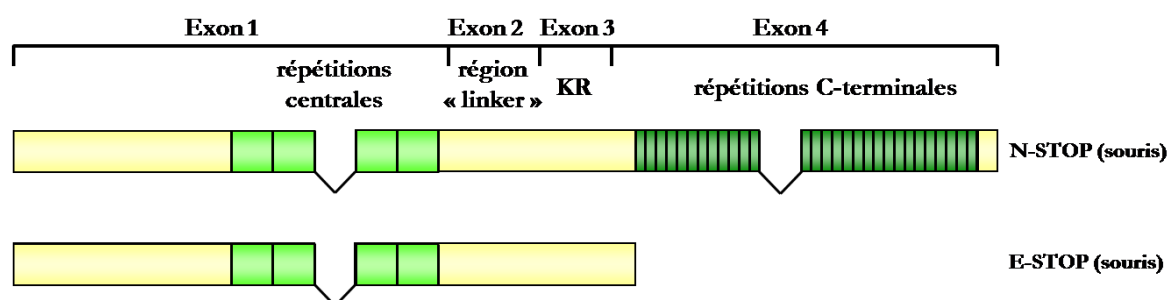


Figure 20 : Représentation schématiques des isoformes neuronales de STOP : la N- et E-STOP.

Le gène codant pour les protéines N- et E-STOP est composé de 4 exons (Exon 1 à 4). La protéine E-STOP est dépourvue des répétitions carboxy-terminales

V – 1-1-1 Expression tissulaire et localisation des STOPs neuronales

Les protéines N-STOP et E-STOP sont spécifiquement exprimées dans les neurones. Mais leur expression varie au cours du développement (Bosc *et al.*, 1996 ; Guillaud *et al.*, 1998). La protéine N-STOP est exprimée uniquement dans le cerveau adulte alors que la protéine E-STOP est majoritairement exprimée dans le cerveau embryonnaire, et persiste en quantité moindre dans le cerveau adulte (Guillaud *et al.*, 1998 ; Figure 20).

Dans les neurones, les protéines N-STOP et E-STOP sont majoritairement associées aux MTs et sont retrouvées dans la fraction Triton-insoluble des lysats neuronaux de ganglions dorsaux de rat (Guillaud *et al.*, 1998). En microscopie électronique, ces protéines apparaissent associées aux microtubules axonaux des ganglions dorsaux de rat, et semblent être réparties de façon homogène sur toute leur longueur (Guillaud *et al.*, 1998). De plus, ces deux isoformes semblent être préférentiellement associées aux MTs stables, détyrosinés et acétylés (Bosc *et al.*, 1996 ; Guillaud *et al.*, 1998 ; Slaughter et Black, 2003).

In vivo, dans la région CA1 de l'hippocampe, les protéines STOPs sont visibles en microscopie électronique dans les épines dendritiques, à proximité de la densité post-synaptique et dans les axones où elles semblent être moins représentées (Andrieux *et al.*, 2002). La purification de synaptosomes montre que les protéines STOPs sont préférentiellement associées à la fraction insoluble des structures synaptiques (Andrieux *et al.*, 2002).

V – 1-1-2 Fonctions des STOPs neuronales

La transfection de l'ADNc des isoformes N-STOP ou E-STOP dans des cellules HeLa, (cellules dépourvues de MTs stables et de STOPs endogènes), confère à leurs MTs une résistance au froid et au nocodazole (agent pharmacologique empêchant la polymérisation des MTs, provoquant ainsi leurs dépolymérisations) (Bosc *et al.*, 1996 ; Guillaud *et al.*, 1998 ; Figure 21). De plus, leur expression ectopique induit la détyrosination des MTs, signe de leur stabilité. Les protéines E- et N-STOP présentent donc une activité stabilisatrice des MTs mais jouent aussi un rôle dans la régulation de leur dynamique (Bosc *et al.*, 1996 ; Guillaud *et al.*, 1998).

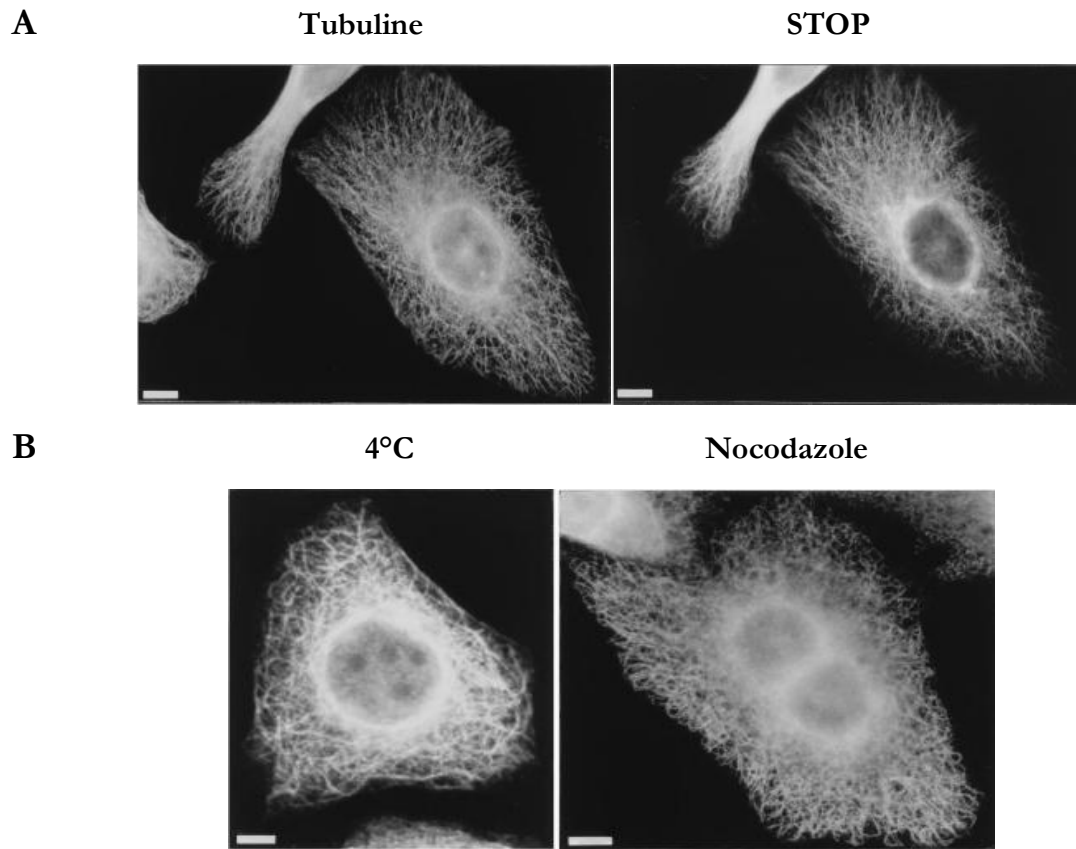


Figure 21 : Stabilisation des microtubules des cellules HeLa après transfection de l'ADNc de N-STOP. Les cellules HeLa sont transfectées avec l'ADNc codant pour la protéine N-STOP. Après 48 h, les cellules sont soit immédiatement fixées (**A**) soit exposées au froid (4°C) soit au Nocodazole 10µM (**B**). **A/** Les cellules HeLa sont doublement marquées à l'aide d'un anticorps anti-tubuline (Tubuline) et d'un mélange d'anticorps dirigés contre la protéine N-STOP. **B/** Marquage de la tubuline après exposition au froid (4°C) ou au Nocodazole des cellules HeLa transfectées. D'après Bosc *et al.*, 1996.

L'injection d'anticorps dirigés contre l'extrémité amino-terminale ou carboxy-terminale des répétitions centrales des protéines STOPS dans les cellules PC12 (lignée cellulaire de type neuronale) différenciées ne modifie pas la structure du réseau microtubulaire en conditions normales de culture (à 37°C) mais supprime leur résistance au froid et au nocodazole. Cette injection n'entraîne pas de modifications de la morphologie des neurites pré-existants. En revanche, l'inactivation de la protéine STOP dans les cellules PC12 par des ARN antisens entraîne un défaut de croissance neuritique (Guillaud *et al.*, 1998).

V – 1-2 Les isoformes non-neurales

D'autres isoformes de STOPS ont été mis en évidence dans différents extraits tissulaires (Pirollet *et al.*, 1989).

L'isoforme F-STOP (STOP Fibroblastique) a été caractérisée dans une lignée cellulaire, les fibroblastes NIH-3T3, elle a un poids moléculaire apparent de 42 kDa (Denarier *et al.*, 1998b). L'ARNm F-STOP étant dépourvue des exons 3 et 4, la protéine correspondante est donc essentiellement composée des répétitions centrales et du domaine « linker » (Figure 22). L'ARNm F-STOP est transcrit à partir d'un promoteur différent de celui des ARNm E-STOP et N-STOP (Aguzzoul *et al.*, 2003). Deux autres isoformes, O-et A-STOP, de poids moléculaires respectifs de 89 et 60 kDa, ont été également identifiées : la O-STOP est l'isoforme majoritaire des oligodendrocytes et la A-STOP est préférentiellement détectée dans les astrocytes. La protéine O-STOP contient les séquences codées par l'exon1 et 4 alors que la protéine A-STOP serait essentiellement codée par l'exon 2 (Galliano *et al.*, 2004 ; Figure 22).

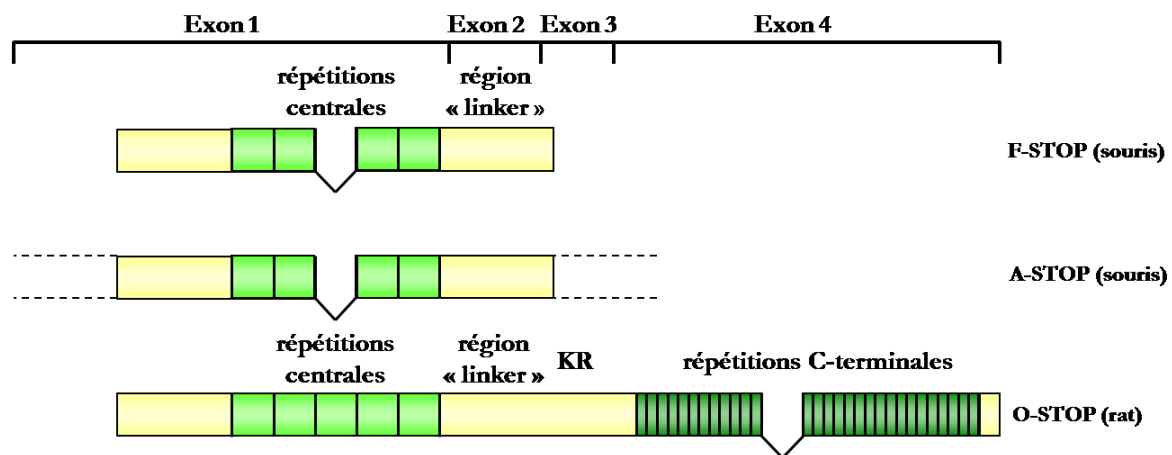


Figure 22 : Représentation schématis des isoformes non neuronales des STOP : F-STOP, A-STOP et O-STOP.

V – 1-2-1 Expression tissulaire et localisation des STOPS non-neuronales

La protéine F-STOP est exprimée de façon ubiquitaire dans de nombreux tissus chez l'animal (Aguzzoul *et al.*, 2003). Elle est également présente dans des astrocytes en culture (Galliano *et al.*, 2004). L'expression tissulaire des isoformes O- et A-STOP n'a pas fait l'objet d'une étude détaillée.

A 37°C Les protéines F-STOP et A-STOP sont détectées dans le cytosol (i) des fibroblastes NIH-3T3 et (ii) des astrocytes, respectivement. En revanche, au cours de la mitose, la protéine F-STOP est localisée au niveau du fuseau mitotique (Denarier *et al.*, 1998b).

L'exposition au froid induit une redistribution des protéines F-STOP et A-STOP et une modification de leur association au réseau microtubulaire (Denarier *et al.*, 1998b ; Galiano *et al.*, 2004).

L'isoforme O-STOP est, quand à elle, détectée dans le corps cellulaire et les prolongements des oligodendrocytes en culture, quelque soit leur stade de différenciation (Galiano *et al.*, 2004).

V- 1-2-2 Fonctions des isoformes non-neuronales

Les cellules HeLa transfectées avec l'ADNc de la protéine F-STOP et les astrocytes (exprimant naturellement les isoformes F- et A-STOP) possèdent un réseau microtubulaire résistant au froid mais labile au nocodazole (Denarier *et al.*, 1998b ; Galiano *et al.*, 2004). Au contraire, les microtubules des oligodendrocytes sont résistants à la fois au froid et au nocodazole grâce à l'expression de la protéine O-STOP (Galiano *et al.*, 2004). Les protéines STOP non-neuronales présentent donc une activité stabilisatrice des MTs mais seule la protéine O-STOP joue aussi un rôle dans la régulation de leur dynamique.

L'injection d'anticorps dirigés contre les répétitions centrales de la F-STOP dans les fibroblastes NIH-3T3 ne modifie pas la structure du réseau microtubulaire en conditions physiologiques mais supprime sa résistance au froid (Denarier *et al.*, 1998b). La protéine F-STOP est responsable de la stabilité des MTs au froid dans les cellules fibroblastiques.

V -2 Domaines fonctionnels des STOPs

V - 2-1 Domaines de liaison aux microtubules

Comme nous l'avons déjà mentionné, les protéines STOPs confèrent aux MTs la capacité de résister au froid et au nocodazole. Cette activité varie suivant les isoformes de STOPs (Bosc *et al.*, 1996 ; Guillaud *et al.*, 1998 ; Denarier *et al.*, 1998b ; Galiano *et al.*, 2004). Une étude structure-fonction a donc été réalisée. Des tests de résistance au froid et au nocodazole de cellules HeLa transfectées avec des fragments ou des mutants de délétion des protéines STOPs a permis de mettre en évidence des modules fonctionnels d'interaction avec les MTs (Bosc *et al.*, 2001). Deux types de domaines d'interaction aux MTs ont alors été caractérisés : les modules Mn (pour Microtubule nocodazole) et les modules Mc (pour Microtubule cold) (Figure 23).

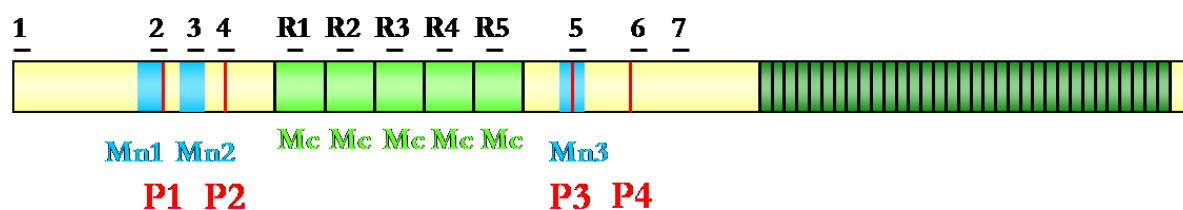


Figure 23 : Représentation schématique des modules fonctionnels de la protéine N-STOP de rat. La N-STOP possède 8 modules de liaison et de stabilisation des microtubules, 3 modules **Mn** (Mn1 à Mn3) et 5 modules **Mc** (répétitions centrales). Elle possède également 12 sites de liaison à la calmoduline (-). 1-7 : Cam1 à Cam7 ; R1 à R5 : CamR1 à CamR5. **Mn** : Modules de liaison aux microtubules induisant leurs stabilisation au froid et au nocadazole ; **Mc** : Modules de liaison aux microtubules induisant leurs stabilisation au froid. **P1, P2, P3 et P4** sont les sites de phosphorylations par la CamKII.

Les modules Mn sont capables d'induire une résistance des MTs au froid et d'inhiber leur dynamique en conditions physiologiques (résistance des MTs au nocadazole). Les modules Mc, quant à eux, sont capables d'induire une résistance des MTs au froid mais n'ont aucune influence sur leur dynamique (pas de résistance des MTs au nocodazole). Notons que chaque répétition centrale correspond à un module Mc (Figure 23). Le nombre de modules Mn et Mc varie suivant les isoformes de protéines STOPS, ce qui pourrait expliquer leurs propriétés différentes dans la stabilisation des MTs.

V – 2-2 Domaines de liaison à la calmoduline

La première purification de la N-STOP avait permis de conclure que cette protéine a une activité stabilisatrice des MTs inhibée en présence de calmoduline liée au calcium (Pirollet *et al.*, 1992). La N-STOP est retenue sur une colonne de calmoduline-agarose, en présence de calcium uniquement (Bosc *et al.*, 1996). Des sites de liaison à la calmoduline ont donc été recherchés par la technique du « peptide spot », ce qui a permis d'identifier 12 sites de liaison avec la calmoduline : les sites Cam1 à Cam7, et les sites CamR1 à CamR5 (Figure 23 ; Bosc *et al.*, 2001). Ces sites de liaison à la calmoduline sont tous chevauchants avec les sites de liaison et de stabilisation des MTs, sauf le site Cam1 : les trois modules Mn de la N-STOP recouvrent les sites Cam2, Cam3 et Cam5 et les modules Mc sont recouverts par les sites CamR1 à CamR5 (Figure 23).

La superposition des sites de liaison aux MTs et à la calmoduline expliquerait la compétition existant entre la liaison des protéines STOPS aux MTs et à la calmoduline (Job *et al.*, 1983). La fixation de la calmoduline aux protéines STOPS empêcherait leur fixation aux MTs et inhiberait ainsi leur activité de liaison et de stabilisation des MTs.

V – 2-3 Sites de phosphorylation par la CamKII

L'analyse de la séquence de l'ADNc codant pour les protéines STOP a mis en évidence 4 sites potentiels de phosphorylations par la Calmoduline Kinase II (CamKII ; Bosc *et al.*, 1996). Ces sites ont été nommés P1 à P4 (Figure 23). Des études récentes ont montré que la N-STOP est bien phosphorylée par la CamKII en présence Ca^{2+} /calmoduline (Baratier *et al.*, 2006). Des anticorps dirigés spécifiquement contre les sites de phosphorylation montrent qu'*in vivo*, la protéine N-STOP est phosphorylée au moins sur les sites P2 et P4 (Baratier *et al.*, 2006). Les anticorps spécifiques des sites P1 et P3 n'ont pas pu être purifiés en assez grande quantité pour pouvoir réaliser l'étude. Ces sites sont chevauchants avec les sites de liaison à la calmoduline (Figure 23), laissant imaginer une compétition entre phosphorylation par la CamKII et liaison à la calmoduline. La liaison de la STOP à la calmoduline inhibe sa phosphorylation par la CamKII (Baratier *et al.*, 2006).

La forme phosphorylée de STOP (STOP-P) a des propriétés différentes de celles des formes non-phosphorylées. En effet, STOP-P ne lie plus les MTs *in vitro*. De plus, dans des neurones primaires d'hippocampe en culture (âgés 12 jours), STOP-P se localise dans des régions dépourvues de MTs de manière diffuse, notamment au niveau des ramifications axonales et des épines dendritiques. La STOP-P colocalise dans ces régions avec le réseau d'actine (Figure 24A). Dans des neurones d'hippocampe en culture âgés de 45 jours, la STOP-P est retrouvée au niveau des synapses, colocalisant avec des marqueurs pré- et post synaptique (Baratier *et al.*, 2004 ; Figure 24B).

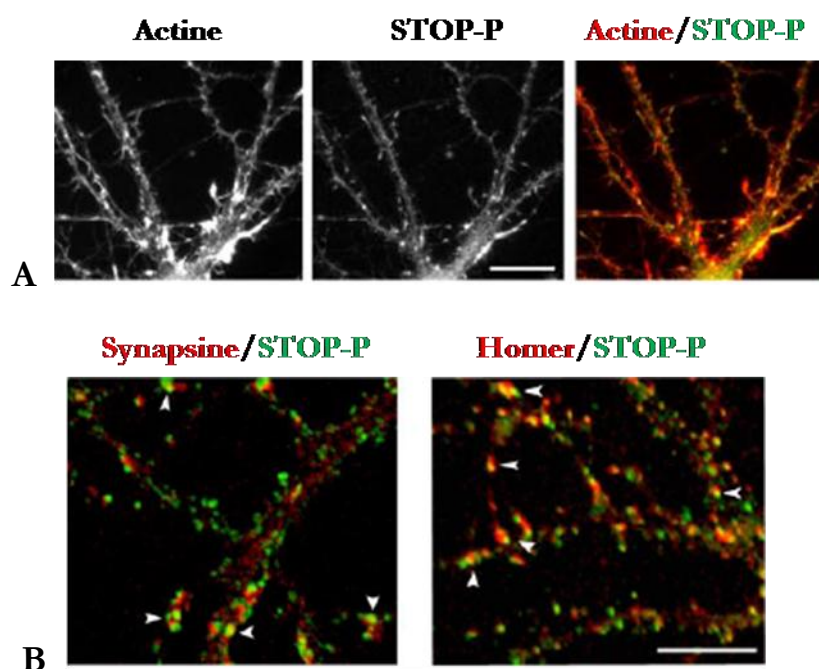


Figure 24 : Localisation de la N-STOP phosphorylée dans des neurones différenciés. A/ Double immunofluorescence sur des neurones d'hippocampe de souris après 12 jours de différenciation *in vitro*.

La STOP-P est révélée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le site P2 (STOP-P). La F-actine est marquée à la phalloïdine Texas Red (Actine) B/ Double immunofluorescence sur des neurones d'hippocampe de souris après 45 jours de différenciation *in vitro*. La STOP-P est révélée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le site P2 (STOP-P). Les synapses sont marquées à l'aide d'anticorps dirigé contre la protéine synapsine ou la protéine Homer. D'après Baratier *et al.*, 2006.

La phosphorylation de la STOP par la CamKII ainsi que la liaison à la calmoduline activée pourraient être deux moyens de réguler sa fonction stabilisatrice des MTs. Cette régulation serait peut être nécessaire à l'établissement de la plasticité synaptique.

V – 3 La souris KO STOP

De manière à analyser le rôle des protéines STOPs dans l'animal entier, des souris déficientes en protéines STOPs (souris KO STOP) ont été générées, au laboratoire, par recombinaison homologue de l'exon 1 du gène STOP avec une cassette contenant un gène rapporteur (β -galactosidase), sous le contrôle du promoteur endogène de la STOP. Les souris KO STOP ainsi produites n'expriment aucune des isoformes de protéine STOPs et sont viables (Andrieux *et al.*, 2002).

Dans des neurones primaires d'hippocampe de souris KO STOP en culture, l'absence de protéines STOPs conduit à une perte complète de stabilité au froid des MTs (Andrieux *et al.*, 2002 ; Figure 25). Les protéines STOP neuronales sont donc les seuls effecteurs microtubulaires impliqués dans la stabilité au froid des MTs.

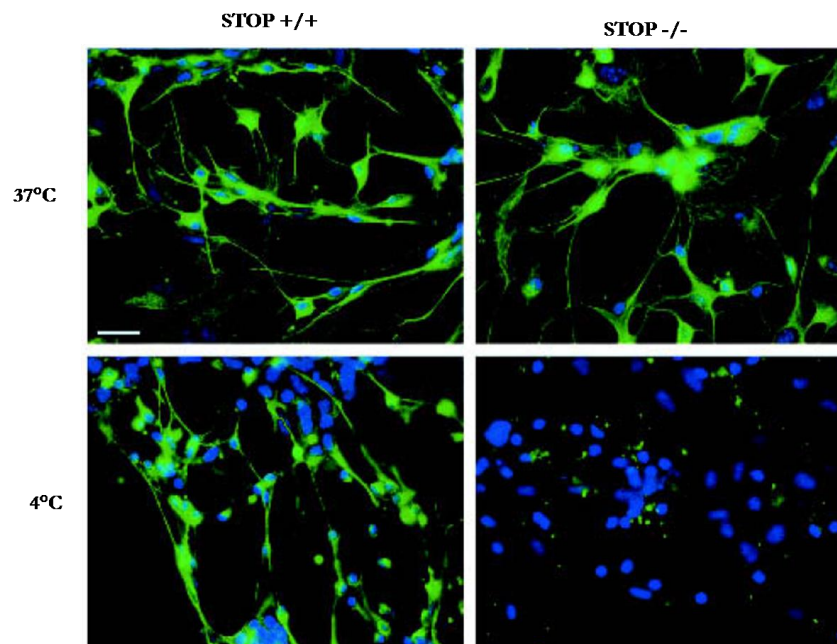


Figure 25 : Perte de la stabilité des microtubules neuronaux au froid chez les souris KO STOP. Des neurones d'hippocampes de souris sauvage (STOP+/+) ou de souris invalidées pour le gène STOP (STOP -/-) sont maintenus à 37°C ou exposés au froid (4°C) pendant 45 minutes. La stabilité du réseau microtubulaire est ensuite analysée par immunocytofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la

tubuline (vert). L'ADN des noyaux est marqué en bleu. D'après Andrieux *et al.*, 2002

Toutes les informations accumulées jusqu'à présent sur la fonction des protéines STOPs laissent penser à une possible implication de la protéine STOP dans la différenciation neuronale (Guillaud *et al.*; 1998). Les résultats obtenus *in vivo* se sont alors avérés surprenants. En effet, le cerveau de ces souris KO STOP ne présente aucune anomalie majeure dans sa morphologie. Le volume cérébral de ces animaux est néanmoins diminué de 20 % par rapport aux souris sauvages (communication personnelle, Deloulme J.C). L'organisation de l'arborisation axo-dendritique de l'hippocampe et des cellules de Purkinje dans le cervelet ne semble pas modifiée. Cependant, le pool de vésicules synaptiques est réduit de 50% dans les terminaisons axonales de la région CA1 de l'hippocampe (Figure 26).

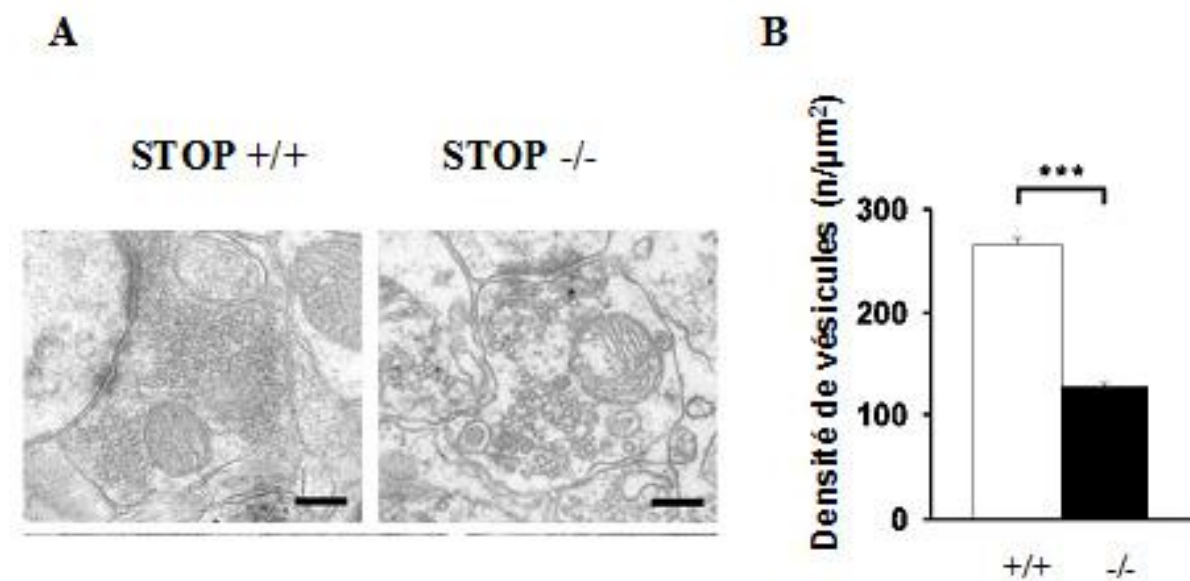


Figure 26 : Analyse ultrastructurale des synapses d'hippocampe de souris KO STOP par microscopie électronique. A. Image en microscopie électronique d'une synapse de souris sauvage (STOP +/+) et de souris STOP KO (STOP -/-). Echelle : 200 nm. **B.** Analyse quantitative de la densité de vésicules synaptiques. *** $p < 0,001$, t-test. D'après Andrieux *et al.*, 2002.

Cette réduction du nombre de vésicules synaptiques est associée à des perturbations sévères de la plasticité synaptique au niveau de la région CA1 de l'hippocampe. Ces perturbations affectent essentiellement la potentialisation et la dépression à long terme (LTP et LTD) alors que la transmission synaptique basale et la « paired-pulse facilitation » dans cette même région, sont normales (Andrieux *et al.*, 2002). Les souris KO STOP présentent également une hyperdopaminergie (Brun *et al.*, 2005) dans le système limbique. Tous ces résultats mettent en avant un rôle des STOP dans la transmission synaptique. Une diminution de l'expression de certaines protéines pré-synaptiques telles que la synaptophysine, GAP43 (Growth Associated Protein43), du transporteur vésiculaire glutamatergique de type 1 (VGlut1) et de protéines post-synaptiques comme la spinophiline a été mise en évidence chez les souris KO STOP. Ces

données corroborent avec une fonction des STOPS dans les régulations de l'activité synaptique (Eastwood *et al.*, 2007).

Associés à ces défauts de transmission, les souris STOP KO présentent de nombreux déficits comportementaux caractérisés par une hyperactivité locomotrice (notamment en réponse à un stress), une activité désordonnée (avec, par exemple, une fragmentation du sommeil) ainsi que des altérations du comportement social et maternel (Andrieux *et al.*, 2002 ; Brun *et al.*, 2005 ; Fradley *et al.*, 2005). Ces troubles comportementaux semblent s'installer progressivement au moment du passage à l'âge adulte, notamment l'hypersensibilité au stress qui n'est observée que chez les souris KO STOP adultes (11-18 semaines) et pas chez les souris KO STOP pré-pubères (4-5 semaines) (Bégou *et al.*, 2007). Ces observations, associées aux défauts de neurotransmission, ressemblent fortement aux symptômes observés chez les patients schizophrènes (Frankle *et al.*, 2003).

Afin de tester cette hypothèse, les souris KO STOP ont été traitées avec des neuroleptiques couramment utilisés dans les traitements de la schizophrénie humaine. Les déficits comportementaux et synaptiques des souris KO STOP sont alors considérablement améliorés par ces traitements. Ces résultats confortent l'hypothèse que les souris STOP KO peuvent être un modèle d'étude de la schizophrénie (Andrieux *et al.*, 2002). En parallèle, des études montraient qu'un gène associé à la schizophrénie, le gène DISC-1 code pour une protéine associée au centrosome, capable d'interagir avec des protéines associées aux MTs (Morris *et al.*, 2003). Ce résultat, en accord avec le modèle STOP, laissait imaginer un lien entre des troubles de l'organisation du cytosquelette, et plus particulièrement des MTs, et la schizophrénie. L'hypothèse que des drogues agissant sur la dynamique microtubulaire pourraient agir sur la transmission synaptique était alors de circonstance. Le laboratoire a testé l'épothilone D, molécule stabilisatrice des MTs traversant la barrière hémato-encéphalique et antiméiotique utilisé en cancérologie clinique (Nettles *et al.*, 2004) , sur les souris KO STOP (Wang *et al.*, 2005). Son administration a permis d'améliorer la transmission synaptique et le comportement des souris STOP KO (Andrieux *et al.*, 2006). Il est donc envisageable d'utiliser l'épothilone D dans le traitement de maladies psychiatriques, telle que la schizophrénie chez l'homme.

Chapitre 3: La palmitoylation dans les neurones

La création de zones d'activité (concentration de complexes de signalisation, par exemple) au niveau de sous-domaines membranaires est nécessaire au bon fonctionnement neuronal (Resh *et al.*, 1999). La modification des protéines par l'ajout d'acide gras joue un rôle important dans cette localisation. En effet, la présence de ces lipides augmente leur hydrophobicité, favorisant ainsi l'interaction avec les membranes. Les modifications les plus courantes sont : la N-myristoylation qui ajoute un acide myristique (acide gras de 14 carbones) sur un résidu glycine en position amino-terminale (Taniguchi *et al.*, 1999), la prénylation qui ajoute un groupement farnesyl ou géranylgeranyl sur un résidu cystéine en position carboxy-terminale (Sinensky *et al.*, 2000), la glycation qui ajoute une ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) sur un résidu situé en carboxy-terminal d'une protéine (Ferguson *et al.*, 1999) et enfin, la palmitoylation que je vais détailler dans ce chapitre. La palmitoylation joue un rôle important au niveau du système nerveux car elle modifie de nombreuses protéines neuronales (comme les récepteurs aux neurotransmetteurs, les protéines d'échafaudage synaptique, etc).

I – La palmitoylation

I - 1 Généralités

La palmitoylation est une modification post-traductionnelle réversible, présente uniquement chez les Eucaryotes (Mitchell *et al.*, 2006). Elle ajoute un acide palmitique ou acide hexadécanoïque (acide gras de 16 carbones), sur un résidu cystéine soit par une liaison N-amide (N-palmitoylation) soit par une liaison thioester (S-palmitoylation) à partir de palmitoyl Coenzyme A (Figure 27). Dans la suite de mon propos, j'assimilerai la palmitoylation à la S-palmitoylation.

Cette modification va augmenter l'hydrophobicité des protéines et permettre leur association aux membranes. Elle joue également un rôle important dans le trafic des protéines entre les différents compartiments membranaires intra-cellulaires en modulant, par exemple, l'interaction protéine-protéine (Resh *et al.*, 1999, Dunphy *et al.*, 1998). L'identification d'inhibiteurs spécifiques de la palmitoylation comme la tunicamycine (Patterson et Skene, 1994), antibiotique possédant des caractéristiques communes avec le palmitoyl-Coenzyme A, ou le 2-bromopalmitate (Webb *et al.*, 2000), palmitate non métabolisable bloquant le site actif de l'enzyme responsable de la palmitoylation, a permis de mieux comprendre la fonction de cette modification.

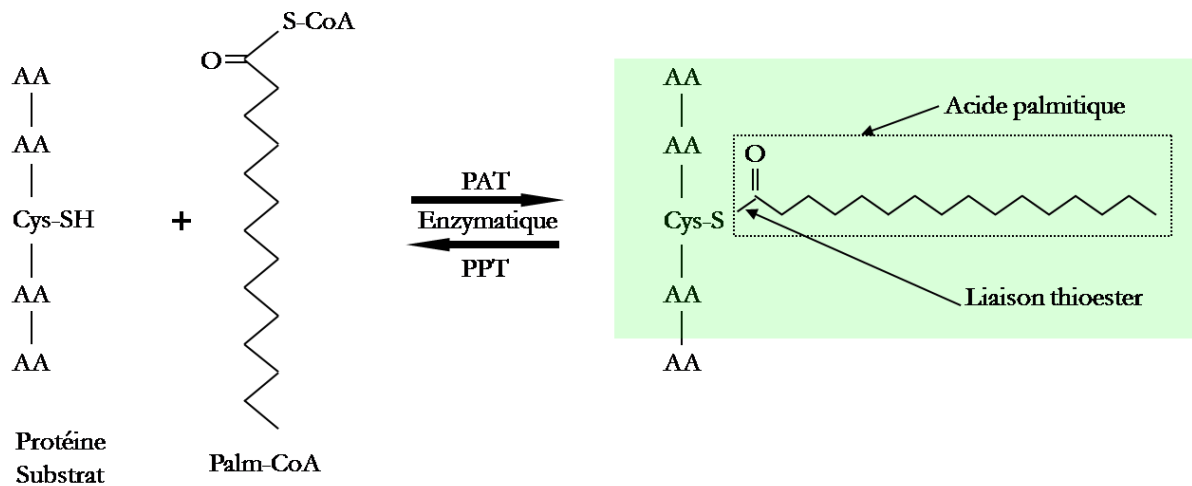


Figure 27 : Palmitoylation et dépalmitoylation d'une protéine. Le groupement Thiol (SH) d'un résidu cystéine peut être palmitoylé soit par réaction spontanée soit par voie enzymatique (Palmitoyl Acyl Transferase, **PAT**). Une liaison thioester est formée entre la protéine et l'acide palmitique. La PalmitoylProtein Thioesterase (**PPT**) est l'enzyme de clivage du lien thioester entre la palmitate et la protéine.

Les protéines palmitoylées sont classées en 4 groupes (Resh, 1999).

- Le premier groupe rassemble les protéines transmembranaires possédant des résidus cystéines palmitoylés au niveau du domaine transmembranaire (récepteurs couplés aux protéines G, par exemple).
- Le deuxième regroupe les protéines de la famille Ras. Une prénylation est tout d'abord réalisée au niveau de la cystéine, présente dans une séquence « CAAX » carboxy-terminale. Puis, une palmitoylation se produit au niveau de cystéines situées en amont de la cystéine prénylée.
- Les protéines palmitoylées au niveau de résidus cystéines, situés dans les 20 premiers aa des extrémités amino- et carboxy-terminale, constituent le troisième groupe (par exemple, la protéine GAP43).
- Le groupe 4 contient les protéines doublement acétylées (d'abord N-myristoylées et ensuite palmitoylées) et présentant une séquence consensus de type Met-Gly-Cys à l'extrémité amino-terminale. La myristoylation est nécessaire mais pas suffisante pour permettre l'insertion de la protéine au niveau de membrane. La palmitoylation est alors l'étape-clé pour cette insertion (Peitzsch *et al.*, 1993).

Aucune séquence consensus de palmitoylation n'a été clairement mise en évidence. Cependant, des caractéristiques communes à plusieurs protéines palmitoylées sont définies :

- la présence d'un domaine favorisant le ciblage à la membrane. Ce domaine contient des résidus hydrophobes/basiques qui encadrent les cystéines (Liu *et al.*, 1993). Les résidus hydrophobes vont se rapprocher des têtes acides des phospholipides membranaires, permettant un rapprochement des résidus cystéines avec la membrane et facilitant alors l'ancrage des protéines au niveau des membranes (Resh *et al.*, 1999).
- la distance entre les cystéines et la région transmembranaire des protéines (protéines du groupe 1).
- une cystéine, proche d'un résidu glycine N-myristoylé ou proche d'une cystéine déjà prénylé en carboxy-terminal.

Il reste cependant difficile de prédire uniquement sur sa séquence si une protéine va ou ne va pas être palmitoylée. Récemment, une caractérisation systématique des protéines palmitoylées d'un organisme a été mise en place (Roth *et al.*, 2006). Cette technique devrait permettre d'identifier un grand nombre de protéines palmitoylées. Deux programmes complémentaires, NBA-Palm et CSS-Palm (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/NBA-Palm> ; http://bioinformatics.lcd-ustc.org/css_palm/), sont capables de prédire les sites de palmitoylation (Xue *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 2006).

Contrairement à la N-myristoylation ou à l'isoprénnylation, la palmitoylation est une modification réversible, impliquant des cycles de palmitoylation via les enzymes Palmitoyl Acyl Transférases (PATs) et de dépalmitoylation via les enzymes Palmitoyl Protein Thioesterases (PPTs) (Figure 27).

I - 2 Mécanismes de palmitoylation

La diversité des protéines palmitoylées ainsi que l'absence de séquence consensus de palmitoylation a rendu difficile la compréhension du mécanisme moléculaire de la palmitoylation.

Divers extraits cellulaires enrichis en protéines palmitoylées ont été obtenus mais aucune activité enzymatique n'a pu être caractérisée (Berthiaume et Resh, 1995 ; Das *et al.*, 1997). La palmitoylation était alors considérée comme une réaction spontanée (Duncan et Gilman, 1996). Le palmitoyl-CoA, donneur d'acide palmitique, est en effet capable, *in vitro*, d'acétyler spontanément une séquence peptidique contenant un résidu cystéine (Bizzozero *et al.*, 2001). Les résidus cystéines sont en effet des résidus très nucléophiles, ils attirent fortement les charges positives, comme celles présentes au niveau de l'acide palmitique. Une liaison thioester labile se

forme entre la cystéine et l'acide palmitique. La palmitoylation ne dépendrait alors que de la concentration en palmitoyl-CoA.

Or, dans la cellule, le pool de palmitoyl-CoA libre est faible. Il est associé à des protéines présentes en grande concentration, le séquestrant et l'empêchant alors de réagir spontanément avec les cystéines. De plus, la palmitoylation *in vivo* est une modification post-traductionnelle très rapide. La cinétique de la réaction spontanée, réalisée *in vitro* en présence de palmitoyl-CoA, est cinq fois plus lente que celle observée *in vivo* (Bharadwaj *et al.*, 1995). Le caractère spontané de la modification *in vivo* est alors peu probable.

Récemment, des études génétiques, d'abord réalisées chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* puis chez les Mammifères, ont permis de mettre en évidence les enzymes impliquées dans la palmitoylation des protéines, (les PATs) et dans la dépalmitoylation (les PPTs) (Figure 27). La balance entre l'activité de ces deux enzymes déterminerait le taux de palmitoylation dans la cellule.

I – 2-1 Les Palmitoyl Acyl Transféraseases

Les PATs ont été initialement identifiées et caractérisées chez la levure *S. Cerevisiae* (Zhao *et al.*, 2002 ; Roth *et al.*, 2002). Elles sont au nombre de quatre et possèdent toutes un domaine DHHC (Figure 28 ; Mitchell *et al.*, 2006). Ce domaine renferme une séquence consensus Aspartate-Histidine-Histidine-Cystéine qui est le domaine catalytique des PATs. Sa délétion ou des mutations dans sa séquence inhibent l'activité palmitoyl-transférase, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Smotrys *et al.*, 2005 ; Fukata *et al.*, 2006). Il est également important de noter, qu'*in vitro* et *in vivo*, les PATs s'auto-palmitoylent au niveau des cystéines du domaine DHHC (Fukata *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2004).

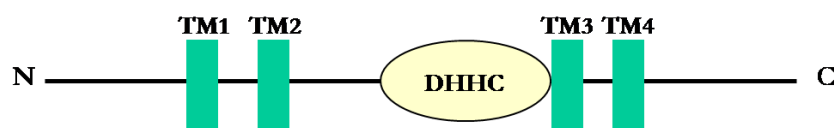


Figure 28 : Représentation schématique de protéines à domaine DHHC. Ces protéines se caractérisent par la présence de 4 domaines transmembranaires (représenté en vert, TM1 à TM4) et par un domaine riche en cystéines et contenant une séquence Aspartate-Histidine-Histidine-Cystéine (DHHC), représenté en jaune.

Un criblage des banques de données avec le domaine DHHC des PATs de levure a permis de mettre en évidence un grand nombre de protéines contenant ce domaine. Chez l'Homme, comme chez la souris, les protéines DHHC sont au nombre de 23. Elles possèdent toutes une structure similaire : 4 domaines transmembranaires (TM1 à TM4), et leur domaines

DHHC situé entre le TM2 et TM3, leur permettant de se localiser au niveau de la face cytoplasmique de la membrane (Politis *et al.*, 2005, Figure 28).

Toutes les séquences de protéines possédant un domaine DHHC ont été étudiées et ainsi regroupées en plusieurs familles dans lesquelles au moins une DHHC de levure cohabite avec les DHHC humaines (Figure 29).

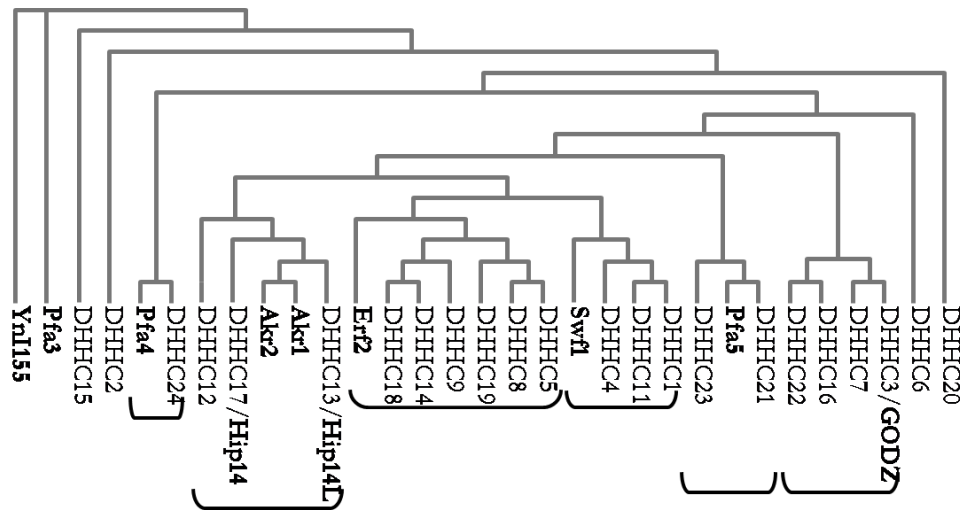


Figure 29 : Arbre Phylogénique des protéines à domaine DHHC (PATs) chez *S. Cerevisiae* et chez l'Homme. Les accolades permettent de visualiser les six sous-familles potentielles. Les DHHC de levures sont notées en gras.

Les 23 protéines DHHC de souris ont été clonées (Fukata *et al.*, 2006). Un criblage a ensuite été réalisé pour évaluer leur capacité à palmitoyer un substrat de palmitoylation déjà connu.

Les études réalisées sur la palmitoylation par les PATs *in vitro*, mettent en évidence plusieurs spécificités de substrats des PATs : il n'existe pas une PAT pour un substrat mais des substrats pour une PAT et plusieurs PATs pour un substrat (Mitchell *et al.*, 2006 ; Budde *et al.*, 2006). Ceci est en adéquation avec l'hétérogénéité des protéines palmitoylées isolées à partir de tissus ou de cellules. Les différentes analyses de l'activité palmitoyl-transférase des différentes DHHC ne se recoupent pas toujours. Le travail d'Huang montre que la PAT HIP14 palmitoyle fortement la protéine PSD-95 (Huang *et al.*, 2004) alors que l'équipe de Fukata ne met en évidence qu'une faible activité de cette PAT sur PSD-95 (Fukata *et al.*, 2004).

Au cours de la palmitoylation, les PATs forment tout d'abord un intermédiaire dit « thioester » avec l'acide palmitique du palmitoyl-CoA. Cette liaison se réalise au niveau du

domaine DHHC (Mitchell *et al.*, 2006). Cet intermédiaire se lie ensuite à la protéine cible et catalyse enfin le transfert de l'acide palmitique sur la cystéine de la protéine cible (Figure 30).

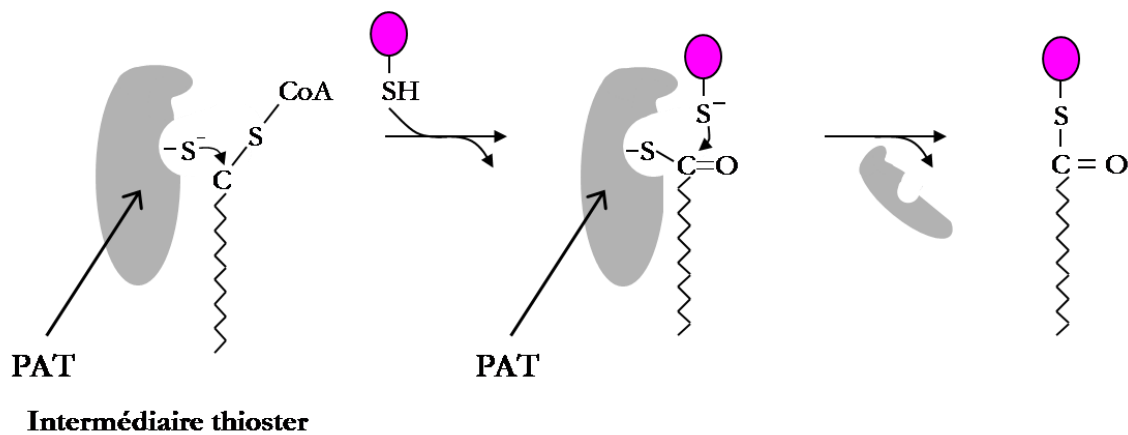




Figure 30 : Mécanismes d'action de la Palmitoyl Acyl Transferase au cours de la palmitoylation.

La PAT (Palmitoyl Acyl Transferase ; ) va tout d'abord former un intermédiaire thioester avec le palmitate du palmitoyl CoA. Elle va ensuite s'associer à la protéine cible () puis catalyser le transfert du palmitate sur le résidu cystéine de la protéine cible.

I – 2-2 Les Palmitoyl Thioestérases

La dépalmitoylation des protéines est réalisée par les Palmitoyl Thioestérases ou PPTs (Figure 27). Deux protéines possédant cette activité ont été décrites: la protéine APT1 (Acyl Protein-Thioestérase 1) et la protéine PPT1 (Palmitoyl Protein thioestérase 1) (Linder et Deschenes, 2003).

La protéine cytoplasmique APT1 est impliquée dans le clivage de l'acide palmitique présent sur la queue cytoplasmique de protéines membranaires, comme par exemple la sous-unité α des protéines G ou la protéine Ras (Duncan *et al.*, 1996). Elle a été identifiée par biochimie dans un extrait de foie de rat.

La protéine PPT1 a été purifiée à partir d'extraits de cerveau de bœuf (Camp et Hoffmann, 1993 et 1994). D'abord identifiée comme une hydrolase lysosomiale, elle contribue à la dégradation des protéines palmitoylées en déacétylant leurs cystéines. Dans les neurones, elle est localisée au niveau de granules présents dans le soma et dans les prolongements et terminaisons neuritiques et colocalise avec des protéines synaptiques comme la synaptophysine (Heinonen *et al.*, 1999). Elle est impliquée dans la dépalmitoylation de nombreuses protéines neuronales, dont SNAP-25, GAP-43, au cours de leur transport dans la voie de dégradation (Cho *et al.*, 2000). Elle est impliquée dans une maladie neurodégénérative: la Céroïde Lipofuscinose

Neuronale, caractérisée par une accumulation de granules de dégradation causant la perte de neurones corticaux (Suopanki *et al.*, 1999).

I - 3 Les sites de palmitoylation

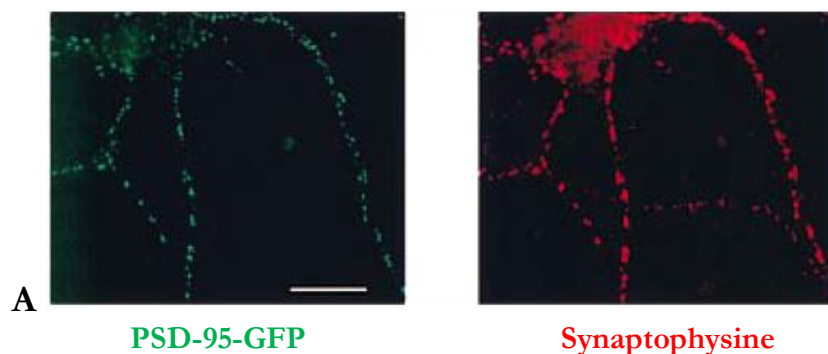
La palmitoylation peut se réaliser au niveau de plusieurs sites : la membrane plasmique, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, la membrane mitochondriale et les membranes synaptiques (Resh *et al.*, 1999 ; Smotrys et Linder , 2004). La caractérisation des enzymes responsables de la palmitoylation a permis de déterminer plus précisément le site de palmitoylation d'une protéine (Resh *et al.*, 2006 ; Greaves *et al.*, 2007). Si nous prenons l'exemple de la PAT HIP14 (DHHC 13). Elle se localise dans différents sites au sein du neurone : au niveau de l'appareil de Golgi, des organites tubulo-vésiculaires, de l'axone, des dendrites mais également au niveau du cou de l'épine dendritique (Huang *et al.*, 2004) suggérant qu'en fonction de ses cibles, HIP14 peut agir à différents endroits.

II – Rôle de la palmitoylation dans les neurones

Un grand nombre de protéines neuronales, et plus particulièrement des protéines synaptiques, peuvent être palmitoylées (El-Husseini et Bredt, 2002). La palmitoylation semble jouer un rôle important dans le développement neuronal et dans la transmission synaptique.

II – 1 Ciblage aux membranes et tri des protéines

Une des principales fonctions de la palmitoylation est de localiser les protéines au niveau des membranes. La protéine PSD-95 est palmitoylée au niveau de deux cystéines situées à l'extrémité amino-terminale. Sa palmitoylation lui permet alors de se localiser au niveau des membranes post synaptiques (Craven *et al.*, 1999). La mutation de ces résidus cystéine abolit sa palmitoylation et sa localisation au niveau de sites post-synaptiques pour une localisation diffuse dans les dendrites (El-Husseini *et al.*, 2000 ; Craven *et al.*, 1999 ; Figure 31).



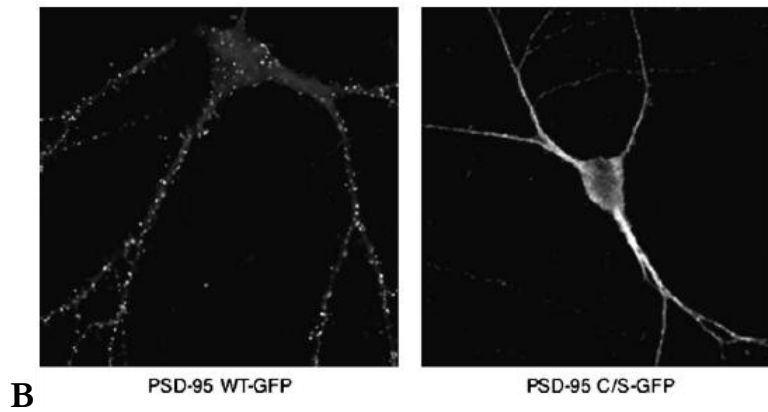


Figure 31 : Localisation de PSD-95 au niveau post synaptique dépend de la palmitoylation de ses cystéines. (A) Après transfection, PSD-95-GFP colocalise avec un marqueur synaptique, la synaptophysine. (B) Après transfection, PSD-95 sauvage couplée à la GFP (PSD-95-GFP) est regroupée au niveau de la membrane des épines dendritiques de neurones d'hippocampe alors que son double mutant cystéine (PSD-95C/S-GFP) est diffus dans toutes les extensions dendritiques. D'après El-Husseini *et al.*, 20001 et Craven *et al.*, 1999.

Toutes les protéines neuronales palmitoylées ne sont pas réparties de façon homogène au niveau des membranes. Certaines sont modifiées et restent associées à l'appareil de Golgi, d'autres vont se concentrer au niveau des rafts lipidiques, sous-domaines membranaires très riches en cholestérol et en sphingomyéline, insolubles dans les détergents non-ioniques (Schroeder *et al.*, 1994). Ces rafts jouent un rôle important dans le tri et le routage des protéines, soit au niveau des dendrites, soit au niveau de l'axone (Ledesma *et al.*, 2003). Les protéines palmitoylées insérées au niveau de ces rafts vont être transportées majoritairement au niveau de l'axone. Par exemple, la palmitoylation de GAP-43 l'insère au niveau des rafts, lui permettant de se localiser par la suite au niveau du cône de croissance axonal (Perez *et al.*, 1998 ; Arni *et al.*, 1998 ; El-Husseini *et al.*, 2001).

L'ajout d'acide palmitique au niveau des cystéines des protéines ne permet pas, à lui seul, de comprendre le ciblage préférentiel vers les dendrites ou l'axone des protéines. En effet, l'environnement des cystéines palmitoylées influence cette localisation (El-Husseini *et al.*, 2001). La protéine GAP-43 est également palmitoylée au niveau de deux cystéines amino-terminales (Skene *et al.*, 1989). Elle peut alors s'associer aux membranes, et se localiser au niveau du cône de croissance axonal (Liu *et al.*, 1993). Des expériences d'échange des domaines amino-terminaux de GAP-43 et de PSD-95 (Figure 32A ; El-Husseini *et al.*, 2001) permettent de conclure que le domaine de palmitoylation de PSD-95 est nécessaire mais pas suffisant pour exclure une protéine de l'axone et que le domaine de palmitoylation de GAP-43 est, quant à lui, suffisant pour cibler une protéine au niveau des axones. Ces résultats mettent également en évidence que l'espace

entre les deux cystéines palmitoylées et la présence de résidus basiques et hydrophobes encadrant ces résidus semblent importants dans le ciblage de protéines palmitoylées (Figure 32B).

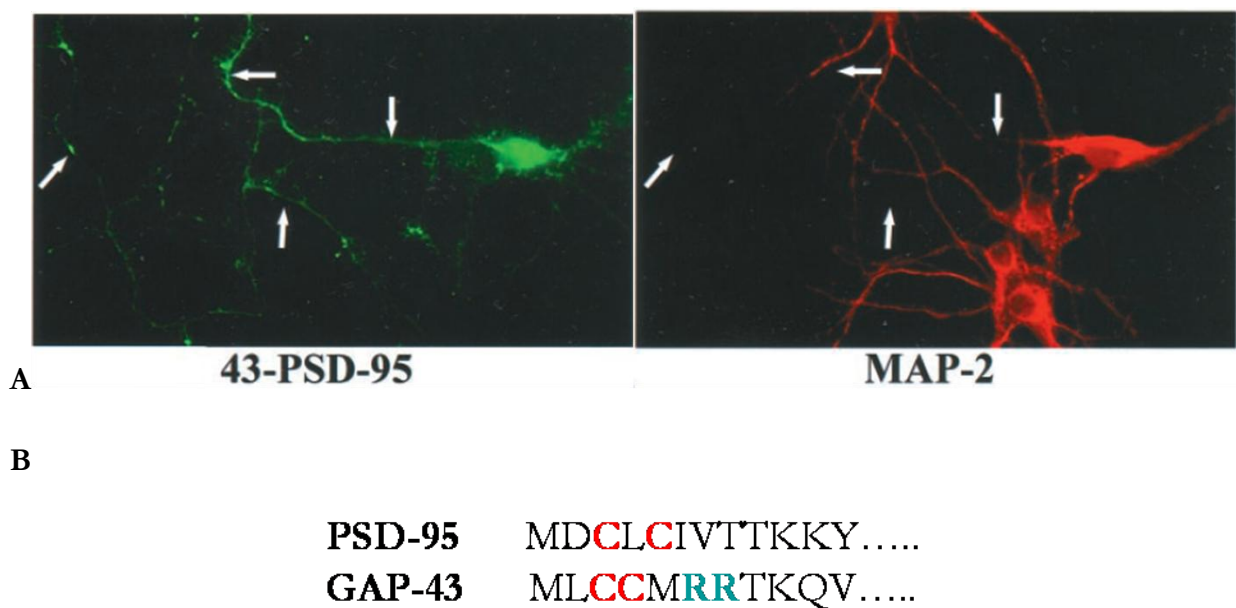


Figure 32 : Séquence de palmitoylation pour cibler les protéines dans l'axone. **A/**Le motif de palmitoylation de GAP-43 fusionné à PSD-95 (43-PSD-95) localise PSD-95 (flèche) au niveau de l'axone. Les cellules sont marquées à l'aide d'un anticorps anti MAP2, protéine exprimée au niveau des dendrites. **B/**Les 12 premiers aa amino-terminaux du domaine de palmitoylation des protéines PSD-95 et GAP-43. Les cystéines (en rouge) ainsi que les résidus basiques (en bleu) sont importants pour une localisation axonale des protéines. D'après El-Husseini *et al.*, 2001

II – 2 Croissance axonale

Outre son implication dans le ciblage des protéines, la palmitoylation jouerait un rôle dans la croissance neuritique .

En présence de tunicamycine, antibiotique inhibant la palmitoylation, les cônes de croissance axonaux de neurones en culture se rétractent (Patterson *et al.*, 1994). La palmitoylation dans sa globalité est donc nécessaire dans le développement des axones. De plus, de nombreuses protéines neuronales palmitoylées sont situées au niveau du cône de croissance axonal (Tableau

1). Comme nous l'avons déjà mentionné, la palmitoylation permet à la protéine GAP-43 d'être associée à la membrane du cône de croissance axonal (Skene *et al.*, 1989). Les cycles de palmitoylation/dépalmitoylation de GAP-43 sont impliqués dans l'extension des axones (Baker *et al.*, 1997 ; Patterson *et al.*, 1999). Le domaine de palmitoylation est, en effet, à lui seul, suffisant pour augmenter le nombre de filopodes nouvellement formés, mais n'est pas suffisant pour former des filopodes axonaux (Figure 33 ; Gauthier-Campbell *et al.*, 2004).

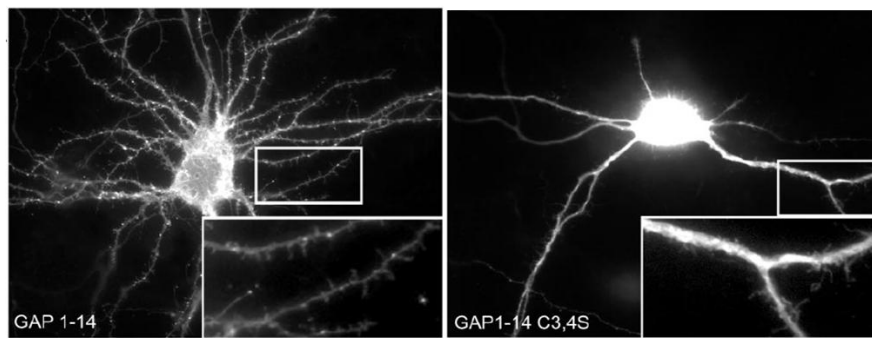


Figure 33 : Induction de filopodes et de branchements dans les neurones par le domaine de palmitoylation de GAP-43. Des neurones d'hippocampe en culture transfectés avec soit la forme sauvage du domaine de palmitoylation de GAP-43 (GAP1-14 ; à gauche) soit un mutant cystéine du site de palmitoylation de GAP-43 (GAP1-14 C3, 4S, à droite) révèlent une induction de la formation de branchement par la forme palmitoylée de GAP-43. D'après Gauthier-Campbell *et al.*, 2004.

Cependant, la palmitoylation de GAP-43 n'expliquerait peut-être pas les changements de morphologie de la membrane du cône de croissance : ils pourraient être liés à l'insertion de l'acide palmitique au sein de la membrane. L'acide palmitique est un acide gras saturé rigide qui en s'insérant dans la membrane modifie sa fluidité, ce qui pourrait alors induire des changements de morphologie cellulaires (Raucher *et al.*, 2000).

La palmitoylation de la protéine NCAM-140, protéine d'adhésion cellulaire, est responsable de sa localisation au niveau des rafts lipidiques du cône de croissance. L'association de NCAM-140 au raft est impliquée dans l'induction de la croissance neuritique (Niethammer *et al.*, 2002).

II – 3 Signalisation pré- synaptique

Au niveau de l'extrémité pré-synaptique, de nombreuses protéines palmitoylées sont impliquées dans le transport et dans la fusion membranaires des vésicules synaptiques (Tableau 1, El-Husseini et Brecht, 2002). La protéine SNAP-25 (Synaptosome Associated Protein-25) appartient au complexe SNARE qui est nécessaire à l'arrimage et à la fusion des vésicules synaptiques à la membrane. La palmitoylation des cystéines de SNAP-25 est responsable de la

dissociation du complexe SNARE (Lane et Liu, 1997). Cette dissociation a lieu avant que la sécrétion des neurotransmetteurs soit réalisée (Washbourne *et al.*, 2001 ; Figure 34). Ainsi, l'équilibre palmitoylation/dépalmitoylation de SNAP25 régule la libération des neurotransmetteurs. Deux autres protéines impliquées dans la fusion vésiculaire sont palmitoylées : α -SNAP (α -soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachement protein) et VAMP (vesicle-associated-membrane protein). Cependant, le rôle de leur palmitoylation n'a pas encore été élucidé. La protéine Synaptotagmine I, protéine membranaire des vésicules synaptiques, est également palmitoylée, elle est ainsi transportée au niveau pré-synaptique et joue alors son rôle dans la régulation de la fusion membranaire (Figure 34 ; Kang *et al.*, 2004 ; Lin et Scheller, 2000).

| Protéine | Séquence de palmitoylation | Localisation de la séquence | Fonction de la palmitoylation |
|---|--|-----------------------------|--|
| Récepteurs et canaux ioniques | | | |
| <i>Récepteurs couplés aux protéines G</i> | | | |
| Rhodopsine | VTTL CCG KNPLGD | Interne | Régulation de l'activité |
| Récepteur 5-HT | FLIIL CCDDERYKR | Interne | Régulation de l'activité |
| mGluR4 | ND | Interne | ND |
| Récepteur à la dopamine D1 | LG CYRLCPAT | Interne | Régulation de l'activité |
| <i>Récepteurs et canaux ioniques</i> | | | |
| GluR6 | KRSFCSAMVEELRMSLKCQR R | Interne | ND |
| nAChR | ND | ND | ND |
| Sous unité α des canaux sodiques | ND | ND | ND |
| Protéines synaptiques | | | |
| Synaptotagmine 1 | VVTCCF CVCKKCL | Interne | ND |
| Synaptobrévine 2 | KNLKMMIILGVICAILILI | Interne | ND |
| SNAP-25 | LG KFCGLCVCPCKLKSSDA | Interne | Régulation du relargage des neurotransmetteurs |
| GAD-65 | ARAWCQVAQKFTGGIGNKL C | Interne | ND |
| Protéines de signalisation | | | |
| Protéine G | MG CCTLSEDKAAVERS | N-ter | Modulation de leurs assemblages |

| | | | |
|----------------------------------|--|-------|--|
| H-RAS | RKLNPD ES GP G CMS C KCVLS | C-ter | Localisation à la membrane et aux rafts |
| GAP43 | ML CC MRRTKLTE | N-ter | Localisation aux neurites |
| Paralemmine | DMKKH R C C CSIM | C-ter | Localisation aux axones et aux filopodes |
| Protéine de la famille Stathmine | MAKTAMAYKEKMKELSMLS LI C S C | N-ter | Localisation au Golgi |

Protéines d'échafaudage des canaux ionique

| | | | |
|---|---|-------|------------------------------|
| PSD-95 | MD CL CIVT T TKKY | N-ter | Localisation post-synaptique |
| Sous-unité $\beta 2$ des canaux calciques | MQ CC GLVHRRR | N-ter | Régulation de l'activité |
| GRIP1b | MPGW K KNIPICLQAEEDRE | N-ter | ND |

Tableau 1 : Tableau des protéines neuronales palmitoylées. Les cystéines palmitoylées sont marquées **en rouge**. Les résidus basiques, encadrant les cystéines palmitoylées sont marqués **en vert**. D'après El-Husseini et Bredt, 2002.

La palmitoylation joue également un rôle dans la transmission pré-synaptique en modifiant une enzyme, la protéine GAD-65 (Glutamic Acid Decarboxylase de 65 kDa), impliquée dans la synthèse d'un neurotransmetteur inhibiteur : le GABA (γ -aminobutyric acid). La protéine GAD-65 se localise au niveau de l'appareil de Golgi par une séquence de ciblage au Golgi et une séquence d'ancrage à la membrane. Elle possède également un motif de palmitoylation (impliquant deux cystéines) qui joue uniquement un rôle au niveau de son trafic entre l'appareil de Golgi et l'extrémité pré-synaptique (Kanaani *et al.*, 2002 ; Figure 34). Sa palmitoylation lui permet alors de se localiser au niveau de cette extrémité : la synthèse de GABA pourra se réaliser et ainsi améliorer la transmission GABAergique.

Les canaux calcique voltage-dépendants sont également des cibles des enzymes de palmitoylation (Hurley *et al.*, 2000). Ces canaux sont palmitoylés au niveau de leurs sous-unités β , qui jouent un rôle important dans l'adressage des canaux à la surface et dans la régulation de leur activité. La palmitoylation de cette sous-unité permet d'améliorer la conductance du canal (Qin *et al.*, 1998, Figure 34)

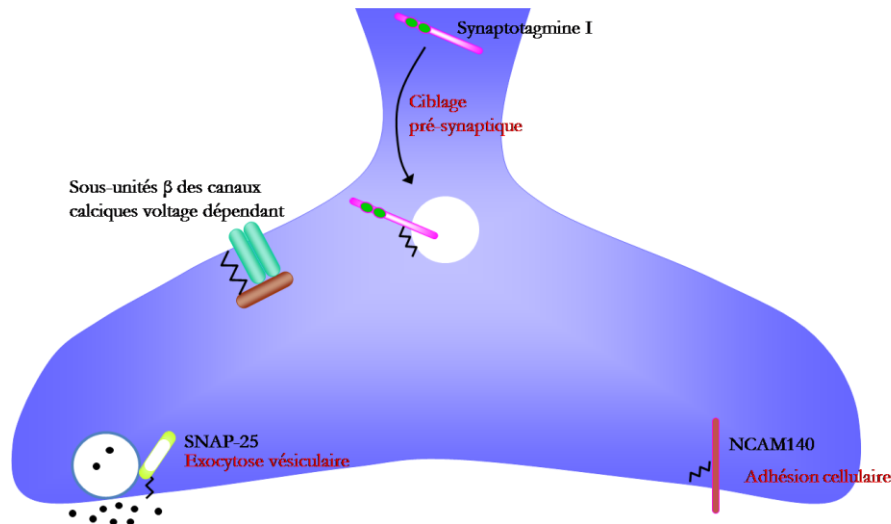



Figure 34 : Régulation de la signalisation pré-synaptique par la palmitoylation. La palmitoylation de certaines protéines régule diverses fonctions importantes au niveau de l'élément pré-synaptiques. Les fonctions sont notées en rouge. Les protéines palmitoylées ont ce sigle  qui est ajouté à leur représentation. D'après Huang et El-Husseini, 2005.

II - 4 Signalisation post-synaptique

La palmitoylation régule également des voies de signalisation au niveau post-synaptique, modulant ainsi la transmission et la plasticité synaptique.

La concentration des récepteurs aux neurotransmetteurs au niveau de la densité post-synaptique (PSD) est un mécanisme important de la signalisation (Figure 35).

Au sein des synapses excitatrices, les récepteurs au glutamate de type AMPA (α -amino-3hydroxy-5methylisoxazole-4-propionic acid) sont un bon exemple. Ils sont constitués de 4 sous-unités (GluR1 à GluR4) qui sont toutes palmitoylées (Hayashi *et al.*, 2005). La palmitoylation de ces sous unités se réalise au niveau de deux sites : le site 1 et le site 2. La palmitoylation du site 2 inhibe leur expression à la surface en les concentrant au niveau de l'appareil de Golgi, où se localise GODZ, l'enzyme responsable de leur palmitoylation (Hayashi *et al.*, 2005). La palmitoylation du site 1 destabilise la liaison de la sous-unité GluR1 avec une protéine de liaison à l'actine, régulant ainsi l'expression à la surface membranaire des récepteurs AMPA.

Le recrutement à la PSD de ces récepteurs dépend de la localisation de la protéine PSD-95 à la PSD qui se réalise via sa palmitoylation. Néanmoins, aucune interaction directe entre

PSD-95 et les récepteurs AMPA n'a été mise en évidence. L'interaction entre les récepteurs AMPA et PSD-95 se réaliserait de manière indirecte, via la protéine Stargazine (Chen *et al.*, 2000). La surexpression de PSD-95 dans des neurones en culture entraîne néanmoins une augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la PSD (El Hussein *et al.*, 2000). La localisation à la PSD de PSD-95 dépend de la palmitoylation de ses deux cystéines, située à l'extrémité amino-terminale (Craven *et al.*, 1999). La mutation du domaine de palmitoylation abolit le regroupement des récepteurs AMPA au niveau de la PSD et favorise leur internalisation (El Hussein *et al.*, 2000). L'ajout de 2-bromopalmitate à des neurones en culture inhibe la palmitoylation de PSD-95 et délocalise également les récepteurs AMPA de la PSD. La protéine PSD-95 subit de nombreux cycles de palmitoylation/dépalmitoylation. Ces cycles vont alors moduler la force synaptique et l'efficacité de la transmission synaptique, en contrôlant la densité des récepteurs AMPA à la surface de la membrane post-synaptique (El Hussein *et al.*, 2002 ; Bredt et Nicoll, 2003). Plus les récepteurs AMPA sont regroupés au niveau de la PSD, meilleure sera la transmission synaptique. La palmitoylation de PSD-95 est également impliquée dans la multimérisation de PSD-95 (Christopherson *et al.*, 2003). Cette étude ne définit pas clairement si la multimérisation joue un rôle dans la localisation de PSD-95 ou dans le regroupement des récepteurs à la PSD.

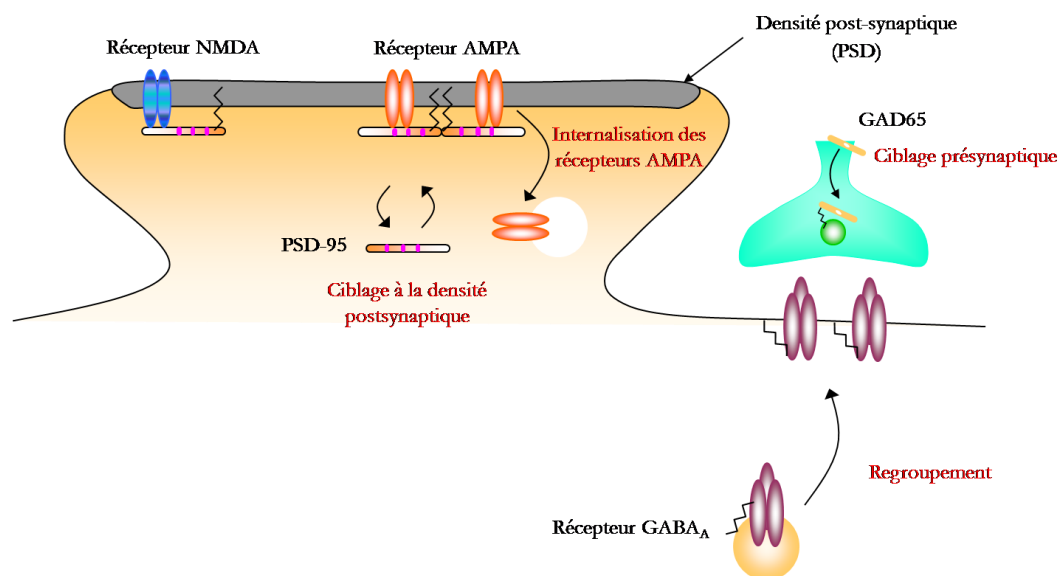



Figure 35 : Régulation de la signalisation post-synaptique par la palmitoylation. La palmitoylation de certaines protéines régule diverses fonctions importantes (en rouge) au niveau de l'élément post synaptiques. Les protéines palmitoylées ont ce sigle  qui est ajouté à leur représentation. D'après Huang et El-Husseini, 2005.

Au sein des synapses glutamatergiques, d'autres types de récepteurs au glutamate sont exprimés : les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-Aspartate). Ces récepteurs se localisent également

au niveau de la PSD, grâce à l'interaction directe entre leur queue carboxy-terminale et la protéine PSD-95 (Kornau *et al.*, 1995). Malgré cette interaction directe, l'inhibition de la palmitoylation par le 2-bromopalmitate n'interfère pas avec la localisation des récepteurs à la membrane (El Husseini *et al.*, 2002). La palmitoylation de PSD-95 n'intervient donc pas dans la localisation à la PSD des récepteurs NMDA, contrairement aux récepteurs AMPA. Une unique fonction de la palmitoylation sur le regroupement des récepteurs à la synapse ne peut être décrite.

Au sein des synapses inhibitrices, le principal neurotransmetteur est le GABA_A (γ-aminobutyric acid de type A) (Rabow *et al.*, 1995). Les récepteurs au GABA_A sont palmitoylés par la protéine GODZ (Keller *et al.*, 2004). Leur palmitoylation est responsable de leur regroupement au niveau des synapses (Figure 31), ce qui est important dans la transmission GABAergique (Fang *et al.*, 2006 ; Rathenberg *et al.*, 2004).

II – 5 Régulation de la palmitoylation par l'activité synaptique

Par les diverses fonctions exercées par les protéines palmitoylées au sein de la synapse (régulation de la libération des neurotransmetteurs, régulation de la transmission du signal synaptique, etc), la palmitoylation est essentielle à la plasticité synaptique. Mais cette modification peut être régulée par différents stimuli, comme par exemple l'activité synaptique.

La stimulation de neurones en culture par du glutamate entraîne l'activation des différents récepteurs au glutamate dont les récepteurs AMPA et NMDA. Cette activation, mimant l'activité synaptique, induit une dépalmitoylation des récepteurs AMPA (augmentation de l'internalisation des récepteurs) suggérant que l'activité synaptique médiée par le glutamate inhibe l'activité des PATs et/ou augmente l'activité des PPTs (Hayashi *et al.*, 2005).

L'activité des récepteurs au glutamate accélère également le cycle palmitoylation/dépalmitoylation de la protéine PSD-95 (El Husseini *et al.*, 2002). Cette stimulation va favoriser la dépalmitoylation de PSD-95 et par conséquent sa délocalisation de la PSD. Les récepteurs AMPA vont alors être moins regroupés au niveau de la PSD et la force synaptique en sera diminuée (El-Husseini et Bredt, 2002).

Objectifs de travail

Dans les cellules neuronales, les protéines STOPs sont des effecteurs puissants de la stabilité et de la dynamique des MTs. Elles interagissent de manière spécifique avec la calmoduline, qui supprime leur activité stabilisatrice. Deux isoformes spécifiques des neurones, une isoforme précoce, la protéine E-STOP et une isoforme adulte, la protéine N-STOP ont été caractérisées. L'étude structure-fonction de ces isoformes a permis de définir différents modules fonctionnels : des modules de liaison et de stabilisation des MTs (les modules Mn et Mc), des domaines de liaison à la calmoduline (Cam1 à Cam7 ; CamR1 à CamR5) et des sites de phosphorylation par la Calmoduline Kinase II (Bosc *et al.*, 2001 ; Baratier *et al.*, 2006).

La recherche dans les banques de données de protéines apparentées aux protéines STOPs a permis d'identifier, à l'aide de sa séquence, une protéine de 21 kDa que le laboratoire a appelé SL21 pour STOP-Like protein de 21 kDa (Bosc *et al.*, 2001). Cette protéine contient deux zones d'homologies avec la protéine N-STOP : un domaine analogue au module Mn3 et à l'extrémité amino-terminale (Figure 36). Aucune autre protéine apparentée n'ayant été mise en évidence auparavant, il a donc semblé particulièrement intéressant de caractériser cette nouvelle protéine.

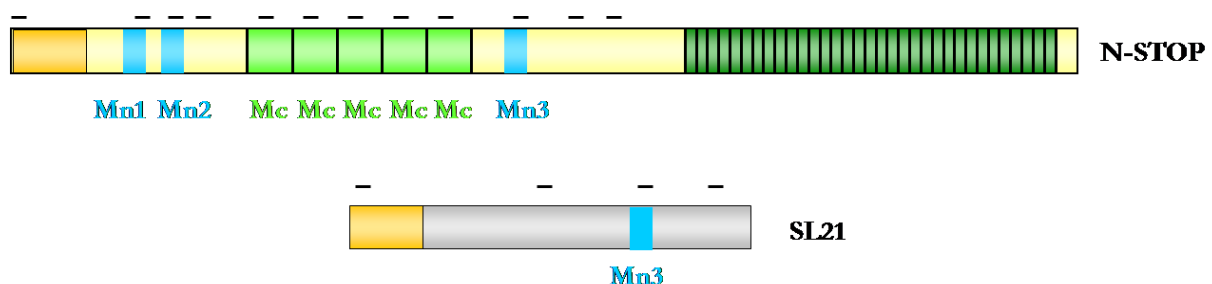


Figure 36 : Zones d'homologie des protéines N-STOP et SL21. Représentation schématique de la N-STOP et de SL21 de souris. Modules de liaison et de stabilisation des microtubules, modules **Mn** (Mn1 à Mn3) et modules **Mc**. Sites de liaison à la calmoduline (-). Le domaine amino-terminal partagé par la N-STOP et SL21 est représenté en jaune.

A mon arrivée au laboratoire, la fonctionnalité du domaine de liaison et de stabilisation des MTs (module Mn3) ainsi que les domaines de liaison à la calmoduline de SL21 avait été démontré. Sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi avait été mise en évidence que ce soit dans des cultures de cellules neuronales ou après transfection de lignées cellulaires.

Le premier objectif de ma thèse a été de comprendre comment SL21 pouvait se localiser au niveau de l'appareil de Golgi alors qu'elle lie les MTs. La conservation du domaine amino-terminal au cours de l'évolution à la fois chez SL21 et chez les STOPs, et également entre les

deux protéines suggère un rôle important de cette extrémité dans leur fonction. Nous avons alors décidé de caractériser cette région amino-terminale.

Et également, afin de mieux comprendre la fonction de la protéine SL21, mon deuxième objectif a été de débiter la caractérisation des partenaires protéiques de SL21 par la validation d'interaction mis en évidence par des tests double-hybride utilisant comme protéine-cible des partenaires de la protéine N-STOP.

I - BIOLOGIE CELLULAIRE

I – 1 Matériels

I - 1-1 Plasmides utilisés

| Nom du plasmide | Description | Origine |
|----------------------|---|---------------|
| SL21 CCC | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris, clonée dans le vecteur pSG5 (<i>Stratagène</i>). | S. Gory-Fauré |
| SL21-GFP | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris, clonée dans le vecteur pEGFP-N1 (<i>Clontech</i>) pour être fusionnée à la protéine GFP à son extrémité carboxy-terminale. | S. Gory-Fauré |
| SL21ΔN | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris, délétée des 35 premiers aa, clonée dans le vecteur pSG5 (<i>Stratagène</i>). | S. Gory-Fauré |
| SL21ΔMn3 | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris, délétée du domaine Mn3 (aa 123-146), clonée dans le vecteur pSG5 (<i>Stratagène</i>). | S. Gory-Fauré |
| SL21 (121-191)-GFP | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris, délétée des aa 2 à 120, clonée dans le vecteur pEGFP-N1 (<i>Clontech</i>) pour être fusionnée à la protéine GFP à son extrémité carboxy-terminale. | S. Gory-Fauré |
| SL21 (1-121)-GFP | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris délétée des aa 122-191, clonée dans le vecteur pEGFP-N1 (<i>Clontech</i>) pour être fusionnée à la protéine GFP à son extrémité carboxy-terminale. | S. Gory-Fauré |
| SL21 CCC -Myc | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21de souris, clonée dans le vecteur pcDNA3.1-Myc-His A (-) (<i>Invitrogen</i>) pour être fusionnée à la protéine Myc à son extrémité carboxy-terminale. | Ce travail |
| SL21 GGG | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris où les cystéines 5, 10 et 11 sont mutées en glycine, clonée dans le vecteur pSG5 (<i>Stratagène</i>). | Ce travail |
| SL21 GGG -Myc | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris où les cystéines 5, 10 et 11 sont mutées en glycine, clonée dans le vecteur pcDNA3.1-Myc-His A(-) (<i>Invitrogen</i>) pour être fusionnée à la protéine Myc à son extrémité carboxy-terminale. | Ce travail |

| Nom du plasmide | Description | Origine |
|----------------------|---|-------------|
| SL21 C GG | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris où les cystéines 10 et 11 sont mutées en glycine, clonée dans le vecteur pSG5 (<i>Stratagène</i>). | Ce travail |
| SL21 C GG-Myc | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris où les cystéines 10 et 11 sont mutées en glycine, clonée dans le vecteur pcDNA3.1-Myc-His A (-) (<i>Invitrogen</i>) pour être fusionnée à la protéine Myc à son extrémité carboxy-terminale. | Ce travail |
| SL21G C G | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris où les cystéines 5 et 11 sont mutées en glycine, clonée dans le vecteur pSG5 (<i>Stratagène</i>). | Ce travail |
| SL21G C G-Myc | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris où les cystéines 5 et 11 sont mutées en glycine, clonée dans le vecteur pcDNA3.1-Myc-His A (-) (<i>Invitrogen</i>) pour être fusionnée à la protéine Myc à son extrémité carboxy-terminale. | Ce travail |
| SL21GG C | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris où les cystéines 5 et 10 sont mutées en glycine, clonée dans le vecteur pSG5 (<i>Stratagène</i>). | Ce travail |
| SL21GG C -Myc | Séquence d'ADNc codant pour la protéine SL21 de souris où les cystéines 5 et 10 sont mutées en glycine, clonée dans le vecteur pcDNA3.1-Myc-His A (-) (<i>Invitrogen</i>) pour être fusionnée à la protéine Myc à son extrémité carboxy-terminale. | Ce travail |
| TcTex1-Myc | Séquence d'ADNc codant pour la protéine TcTex1 de souris, clonée dans le vecteur pcDNA3.1-Myc-His A (-) (<i>Invitrogen</i>) pour être fusionnée à la protéine Myc à son extrémité carboxy-terminale. | F. Dufour |
| N-STOP | Séquence d'ADNc codant pour la protéine N-STOP de rat, cloné dans le vecteur pSG5 (<i>Stratagène</i>). | C.Bosc |
| N-STOP Δ 12aa | Séquence d'ADNc codant pour la protéine N-STOP de rat délétée des 12 premiers aa, cloné dans le vecteur pSG5 (<i>Stratagène</i>). | C. Bosc |
| N-STOP-GFP | Séquence d'ADNc codant pour la protéine N-STOP de rat, cloné dans le vecteur pEGFP-C1 (<i>Clontech</i>) pour être fusionnée à la protéine GFP à son extrémité amino-terminale. | E.Denarier |
| E-STOP-GFP | Séquence d'ADNc codant pour la protéine N-STOP de rat, cloné dans le vecteur pEGFP-C1 (<i>Clontech</i>) pour être fusionnée à la protéine GFP à son extrémité amino-terminale. | E. Denarier |

Tableau 2 : Plasmides utilisés au cours de ce travail

I - 1-2 Anticorps primaires

| Nom (<i>Fournisseur</i>) | Epitope | Espèce | Dilution |
|---|---|---------------------------|-----------------------------|
| 175 (<i>Produit au laboratoire ; Pirollet et al., 1989</i>) | Répétitions carboxy-terminales de la N-STOP de rat | Souris (liquide d'ascite) | 1/200 IF 1/5000 WB |
| 23C (<i>Produit au laboratoire ; Guillaud et al., 1998</i>) | 23 premiers aa de la première répétition centrale de la N-STOP de rat | lapin | 1/5000 WB 1/1000 IP |
| 23N (<i>Produit au laboratoire ; Guillaud et al., 1998</i>) | 23 derniers aa de la dernière répétition centrale de la N-STOP de rat | lapin | 1/5000 WB 1/1000 IP |
| 3315 (<i>Produit au laboratoire ; Gory et al., 2006</i>) | SL21 | lapin | 1/500 IF 1/5000 WB |
| SLF10 (<i>Produit au laboratoire, ce travail</i>) | SL21 | souris | Pur IF Pur WB 1/50 IP |
| Giantine (<i>Covance</i>) | Giantine (protéine membranaire du Golgi) | lapin | 1/2000 IF |
| GM130 (<i>BD Biosciences</i>) | GM130 (protéine de la matrice golgienne) | souris | 1/200 IF |
| YL1/2 (<i>Produit au laboratoire</i>) | extrémité carboxy-terminale de la tubuline tyrosinée | rat | 1/10000 IF |
| Myc (<i>Santa Cruz biotechnology</i>) | extrémité carboxy-terminale de la protéine Myc humaine | souris | 1/400 IF 1/4000 WB |
| GFP (<i>MolecularProbes</i>) | <i>Aequorea victoria</i> GFP | lapin | 1/2000 IP |
| GFP (<i>Roche</i>) | <i>Aequorea victoria</i> GFP | souris | 1/1000 WB |
| Tctex 2026 (<i>Produit au laboratoire</i>) | Extrémité amino-terminale de TcTex1 | lapin | 1/200 IF 1/2000 WB |

Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés au cours de ce travail. IP : immunoprécipitation, WB : Western Blot, IF : immunofluorescence.

I – 1-3 Anticorps secondaires

Les anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les IgG de lapin, de rat ou de souris couplés à la Cyanine 3 (dilution au 1/1000 ; *Molecular Probes*), à la Cyanine 5 (dilution au 1/500 ; *Molecular Probes*), à l’Alexa Fluor 488 (dilution au 1/500 ; *Molecular Probes*) ou couplé à la peroxydase (dilution au 1/10000, *Jackson ImmunoResearch*) ont été utilisés.

I - 2 Méthodes

I – 2-1 Culture cellulaire

I – 2-1-1 Culture des lignées cellulaires

Les cellules NIH-3T3 (3T3), lignées de fibroblastes murins et les cellules COS-7, lignée de fibroblastes de rein de singe vert d’Afrique, immortalisés par transformation avec le virus simien SV-40, proviennent de l’ATCC (American Tissue Culture Collection). Elles sont cultivées dans du DMEM additionné de 10% sérum de veau fœtal (SVF, *Perbio*), de Pénicilline (10000 U/ml ; *Invitrogen*) et de Streptomycine (10000 µg/ml ; *Invitrogen*). Les cellules HeLa, issues d’un carcinome épithélial humain, proviennent également de l’ATCC et sont cultivées dans du RPMI additionné de 10% SVF, de Pénicilline (10000 U/ml) et de Streptomycine (10000 µg/ml) (*Invitrogen*). Ces différentes lignées cellulaires sont incubées dans une étuve à 37° C en atmosphère humide, contenant 5% CO₂. Ces cellules sont toutes adhérentes. Une fois à confluence, elles sont détachées du support par un traitement à la trypsine (trypsine 0,05% / EDTA 0,53 mM ; *Invitrogen*). Elles sont enfin ré-ensemencées à la dilution désirée soit dans des flacons pour l’entretien des cellules soit sur des lamelles de verre pour les expériences d’immunofluorescence, soit dans des boîtes de pétri de 100 mm de diamètre (B100) pour les expériences d’immunoprécipitation et de palmitoylation *in vitro*.

I – 2-1-2 Culture des neurones primaires d'hippocampe de souris

a - Préparation des boîtes de cultures

Les boîtes de culture de 100 mm de diamètre (B100) sont recouvertes de polylysine (Poly-L-lysine, Iodobromide ; *Sigma*) diluée à 1 mg/ml dans du tampon borate 0,1 M, pH 8,5. Après une nuit d'incubation à température ambiante, les boîtes sont rincées à l'eau stérile pendant une heure puis deux fois dix minutes. Enfin, 10 ml de milieu de culture DMEM (*Invitrogen*) / 10% SVF sont ajoutés et les boîtes de culture sont placées dans l'étuve à 37°C en atmosphère humide, contenant 5% CO₂.

b - Obtention de la suspension de neurones d'hippocampe

Les neurones hippocampiques utilisés sont préparés à partir d'hippocampes d'embryons de souris âgés de 18,5 jours. Les hippocampes sont isolés sous une loupe binoculaire à l'aide de pinces fines et ciseaux, puis déposés dans 4,5 ml de milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, *Invitrogen*). Les cellules subissent une dissociation chimique à la trypsine (trypsine 0,05% / EDTA 0,53 mM) à 37°C suivi d'une dissociation mécanique. La suspension cellulaire est ensuite déposée dans des boîtes de culture préalablement conditionnées, comme décrit ci-dessus. Une heure plus tard, le DMEM / SVF 10% est remplacé par du milieu Neurobasal / B-27 2% / Glutamax (*Invitrogen*). La culture est maintenue dans une étuve à 37°C en atmosphère humide contenant 5% CO₂ et complétée une fois par semaine avec du milieu frais contenant de l'AraC (Cytosine Arabinoside, 10µM). Cet agent antimétabolique bloque la prolifération des cellules gliales présentes dans les cultures de neurones primaires.

I – 2-2 Transfection transitoire des lignées cellulaires

Les cellules 3T3, HeLa et COS-7 sont ensemencées sur des lamelles de verre à raison de 12 000 cellules/ml dans des plaques 24 puits (immunofluorescence), de 150 000 cellules/ml dans des boîtes B100 (immunoprécipitations et palmitoylation *in vitro*). La transfection est réalisée 24 heures après l'ensemencement via un vecteur lipidique cationique : la Lipofectamine™ (*Invitrogen*) associée au Reagent Plus (*Invitrogen*), selon les recommandations du fournisseur. Le jour de la

transfection, la densité cellulaire doit être comprise entre 70% et 80% de confluence. Deux solutions A et B sont préparées dans du DMEM : la solution A contient l'ADN plasmidique et le Reagent Plus et la solution B contient la Lipofectamine™. Les quantités de plasmides, de Reagent Plus et de Lipofectamine™ utilisées sont indiquées dans le tableau suivant.

| | Solution A | | Solution B | |
|-------------------------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|
| | Plaque 24 puits | B100 | Plaque 24 puits | B100 |
| Volume DMEM (μ l) | Qsp 75 | Qsp 750 | Qsp 75 | Qsp 750 |
| Plasmide (μ g) | 0.4 | 6 | | |
| Reagent Plus (μ l) | 1.5 | 20 | | |
| Lipofectamine™ (μ l) | | | 2 | 30 |

Tableau 4 : Conditions de transfection des différentes lignées cellulaires à l'aide de la lipofectamine™ / Reagent Plus .

La solution A et la solution B sont incubées 15 minutes à température ambiante. La solution B est ajoutée délicatement à la solution A. Une incubation de 15 minutes est de nouveau réalisée à température ambiante. Un volume de 350 μ l (plaques 24 puits) et de 3500 μ l (B100) de DMEM est additionné au mélange. Le mélange est enfin déposé délicatement sur les cellules qui auront été préalablement rincées au DMEM et où 500 μ l de DMEM auront été ajoutés dans les plaques 24 puits et 5ml dans les B100, respectivement. Les cellules sont incubées pendant 3 heures dans une étuve à 37° C en atmosphère humide, contenant 5% CO₂, puis le milieu est retiré et remplacé par du DMEM / SVF 10%/ PS 1%. Les cultures sont maintenues 24h à 37°C en atmosphère humide, contenant 5% de CO₂ avant d'être utilisées pour des expériences d'immunofluorescence (plaques 24 puits) et de biochimie (B100).

I – 2-3 Traitement des cellules au 2-bromopalmitate

Après 6 heures de transfection, les cellules sont incubées ou non en présence de 100 μ M de 2-bromopalmitate (*Sigma*)/DMEM/2,5% SVF/0,25% defatted-BSA (*Sigma*) pendant 6h. Les cellules sont ensuite rincées au PBS et fixées.

I – 2-4 Fixation

Selon les déterminants antigéniques étudiés et les types cellulaires utilisés, la méthode de fixation diffère car certaines fixations masquent l'antigène et empêchent sa reconnaissance par l'anticorps.

Deux types de fixateur ont été utilisés :

- le méthanol : Les lamelles sont incubées 7 minutes dans du méthanol anhydre à -20° C. Ce solvant organique dissout les lipides, déshydrate les cellules et précipite les protéines en respectant l'architecture cellulaire.
- la paraformaldéhyde : les lamelles sont incubées à 37° C pendant 20 minutes avec une solution de PFA/Sucrose (paraformaldéhyde 4%, saccharose 120mM, qsp PBS). Après 2 lavages dans du PBS, les cellules sont perméabilisées 5 minutes dans du PBS / Triton X-100 0,2%. Le Triton est ensuite éliminé par 2 lavages successifs avec du PBS. La PFA forme des ponts intermoléculaires et préserve mieux les structures membranaires que le méthanol.

I - 2-5 Immunofluorescence indirecte

Après réhydratation des cellules dans du PBS - Tween 20 0,1% (PBS-T), les lamelles sont recouvertes d'une solution de PBS-T contenant les anticorps primaires pendant une heure à température ambiante. Les lamelles sont ensuite lavées dans du PBS-T puis sont incubées 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec l'anticorps secondaire (dilué dans du PBS-T). L'ADN des cellules est ensuite coloré avec un agent intercalant, l'Hoescht 33258 (1 μ g/ml) pendant cinq minutes. Les lamelles sont déshydratées dans de l'éthanol et montées sur des lames de verre à l'aide du liquide de montage FluorSaveTM (Calbiochem). Les cellules sont observées au microscope (Zeiss ; Axioscope) et les acquisitions d'images sont effectuées à l'aide d'une caméra CCD (CoolSnap ES ; Roper Scientific) pilotée par le logiciel Metavue (Universal Imaging Corporation).

II - BIOCHIMIE

II -1 Extraits protéiques

II - 1-1 A partir de cerveaux de souris

Les cerveaux de souris adultes sont prélevés rapidement après le sacrifice par dislocation cervicale et sont immédiatement placés dans l'azote liquide. Les tissus sont ensuite homogénéisés dans du PEM (PIPES 100mM/MgCl₂ 1mM / EGTA 1mM) à 4°C en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases («Complete Mixture Tablets», *Roche Science Applied*) à l'aide d'un « potter ». Une ultracentrifugation à 70 000g pendant 10 minutes à 4°C est réalisée. Le surnageant est dilué au 1/2 pour être utilisé pour les immunoprécipitations.

II - 1-2 A partir de cellules en culture

24h après la transfection, les cellules à récolter sont rincées au PBS et lysées sur la glace dans du tampon IP (Tris 50 mM / NaCl 150mM / Deoxycholate 0,05% / Triton 1% / glycérol 10%, pH 8,0) contenant des inhibiteurs de protéases («Complete Mixture Tablets», *Roche Science Applied*) et en présence de 5 mM de CaCl₂. Après la lyse, la suspension cellulaire est centrifugée à 12 000g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est alors récupéré et du MgCl₂ 5 mM est ajouté. Le lysat brut ainsi obtenu est utilisé pour les immunoprécipitations.

II -2 Immunoprécipitation

Cette technique permet de purifier, à partir d'un extrait protéique, une protéine d'intérêt et ses partenaires potentiels dans le cas d'une co-immunoprécipitation.

Des extraits protéiques sont réalisés comme décrit plus haut. Le lysat brut est alors incubé pendant 2 heures à 4°C, sur la roue, avec 30 µl de billes Sépharose-protéine G ou des billes Sépharose-protéine A (*GE Healthcare*). Le choix de protéine A ou G dépend de l'anticorps que l'on va utiliser : protéine A pour les IgG préparées chez la souris et protéine G pour les IgG préparées chez le lapin. Les billes sont préalablement incubées 2 heures avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Les billes de Sépharose sont collectées par centrifugation à 12 000g pendant 3 minutes à +4°C et sont lavées cinq fois 10 minutes dans le tampon IP. Après

la dernière centrifugation, 50 µl de tampon IP Buffer et 20 µl de tampon G5X (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8/ SDS 2% / Glycérol 10% / β-mercaptoéthanol 1% / bleu de Bromophénol 1%) sont ajoutés au culot (fraction IP) qui est alors chauffé 5 minutes à 95°C. Après migration du lysat brut et des fractions IP sur gel SDS, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et une immunorévélation est réalisée en utilisant un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt (vérification de l'immunoprécipitation) ou un anticorps dirigé contre la protéine partenaire (co-immunoprécipitation du partenaire).

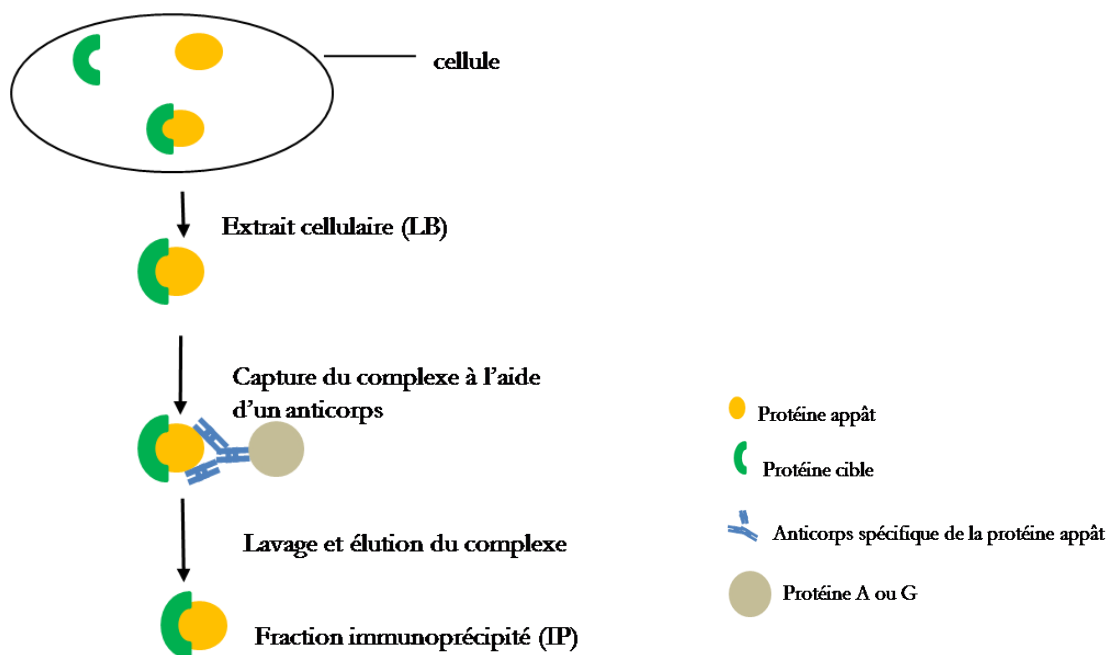


Figure 37 : Représentation schématique de l'immunoprécipitation. L'immunoprécipitation permet d'isoler, à partir d'un extrait protéique, une protéine d'intérêt. Si cette protéine appartient à un complexe, les protéines associées pourront être identifiées. Ce phénomène est alors nommé co-immunoprécipitation.

II – 3 Palmitoylation « *in vitro* » des cellules HeLa et Cos

L'acide palmitique tritié (Amersham Biosciences) est complètement séché sous azote et est ressuspendu dans du DMSO et complétement avec du RPMI / defatted BSA 0.5% (*Sigma*) ou DMEM/ defatted BSA 0.5% (*Sigma*).

Les cellules HeLa ou COS-7 sontensemencées dans des B100 et sont transfectées ou non 24 heures après l'ensemencement. Un jour après la transfection, les cellules sont incubées en présence de 500 µCi d'acide palmitique tritié (*Amersham Biosciences*) pendant 3 heures dans une étuve à 37°C, en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Les cellules sont alors lysées (voir

paragraphe II - 1-2) et une immunoprécipitation (voir paragraphe II - 2-1-1) est réalisée. Après migration du lysat brut et des immunoprécipitats (fractions IP) sur gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pour l'immunodetection (Western-Blot) ou la détection de protéines radiomarquées (voir paragraphe II – 4). L'inhibition de la palmitoylation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, en présence de 100 μ M de 2-bromopalmitate (*Sigma*) 6 heures avant l'ajout de palmitate tritié.

II – 4 Détection et analyse des protéines radiomarquées

Lorsque les protéines sont radiomarquées, elles peuvent être détectées par autoradiographie. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, selon leur poids moléculaire (Laemmli, 1970). Le gel est fixé 30 minutes dans une solution méthanol 50% / acide acétique 10% puis traité 30 minutes à l'« Amplify » (*Amersham Biosciences*) afin d'augmenter le signal radioactif. Le gel lavé à l'eau bidistillée est ensuite séché sur papier Wathman pendant 40 minutes à 80°C (Sécheur de gel Biorad). Le gel séché est enfin placé au contact d'un film autoradiographique (*Kodak*) dans une cassette d'autoradiographie et exposé pendant 10 jours à -80° C. Le film est ensuite révélé et fixé (Produits *Kodak*).

Chapitre 1 : Palmitoylation et localisation aux membranes des protéines SL21 et N-STOP

La première partie de mon travail, portant sur la caractérisation du domaine amino-terminal de SL21 et de STOP, a été intégrée dans le premier papier publié sur SL21 en 2006 : « STOP-like protein 21 is a novel member of the STOP family, revealing a golgi Localization of STOP proteins ». Nous présenterons ensuite les résultats supplémentaires obtenus sur l'étude de la palmitoylation des protéines SL21 et N-STOP.

I – SL21, nouveau membre de la famille des STOPs, révèle une localisation au Golgi des STOPs.

S. Gory-Fauré, V. Windscheid, C. Bosc, L. Peris, D. Proietto, R. Franck, E. Denarier, D. Job, A. Andrieux ; J.B.C (2006) 38 : 28387-28396

I – 1 Résumé

L'analyse de la structure de SL21 a révélée deux régions de fortes homologues avec les protéines STOPs neuronales (N- et E-STOP). La première correspond au module de liaison et de stabilisation des MTs (module Mn3) et la seconde aux 35 premiers acides aminés de l'extrémité amino-terminale. Les régions d'homologie contiennent des motifs fonctionnels des protéines STOPs : des sites de liaison à la calmoduline situés au niveau du module Mn et au niveau des 15 premiers acides aminés de l'extrémité amino-terminale ainsi qu'un module de liaison et de stabilisation des microtubules.

SL21 est capable de lier la calmoduline au niveau de 4 sites (SLCam1 à SLCam4), *in vitro*, dont les deux principaux sont homologues à ceux des protéines STOPs neuronales. De même, SL21 lie les MTs *in vitro*. La transfection transitoire de l'ADNc complet de SL21 dans des cellules HeLa (cellules dépourvues de microtubules stables) entraîne l'apparition de MTs stables au froid et résistants à la dépolymérisation induite par le nocodazole. SL21 est donc capable de s'associer aux MTs, de ralentir leur dynamique et de les stabiliser au froid.

L'étude de l'expression de SL21 par Western-Blot sur différents extraits tissulaires révèle sa présence uniquement dans le cerveau post-natal. L'immunodétection de SL21 sur culture de cellules cérébrales met en évidence son expression dans les neurones exclusivement. Au cours des premiers jours après la mise en culture de ces neurones, la protéine SL21 est concentrée au niveau de l'appareil de Golgi. Après 10 à 16 jours de différenciation *in vitro*, âge où les neurones hippocampiques forment un réseau différencié, SL21 est toujours présente au niveau de l'appareil

de Golgi mais également de façon ponctuelle dans les neurites, colocalisant avec un marqueur du Cis-Golgi (GS28).

La localisation sub-cellulaire de SL21, après transfection transitoire dans les cellules, diffère en fonction du taux d'expression de la protéine. En effet, SL21 se localise, dans un premier temps, au niveau de l'appareil de Golgi puis, à un taux d'expression plus important, elle a une localisation supplémentaire au niveau du réseau microtubulaire.

Pour comprendre comment SL21 pouvait avoir cette localisation duale, au niveau de l'appareil de Golgi et au niveau des MTs, nous avons choisi de réaliser des mutants de délétion de SL21. Nous avons alors pu montrer que l'extrémité amino-terminale est indispensable pour cibler SL21 au niveau de l'appareil de Golgi et que le module Mn3 est nécessaire pour sa localisation au niveau des MTs. La région amino-terminale responsable du ciblage de SL21 au Golgi est partagée avec les STOPs neuronales. Nous avons montré que la protéine N-STOP se localise également au niveau du Golgi à faible taux d'expression via son domaine amino-terminal et qu'à plus fort taux d'expression, elle a une localisation supplémentaire au niveau des MTs.

Enfin, nous avons analysé la séquence de l'extrémité amino-terminale de SL21 et des STOPs neuronales pour déterminer ce qui pouvait expliquer le ciblage au Golgi. Cette extrémité contient trois résidus cystéines, en position 5, 10 et 11, encadrés par des résidus basiques qui constituent un environnement favorable à la palmitoylation (modification permettant l'association de protéines aux membranes). Nous avons montré que SL21 était palmitoylée au niveau de ces cystéines et qu'elles sont nécessaires à sa localisation au Golgi de SL21.

En conclusion, nous avons montré que SL21 est une nouvelle MAP neuronale appartenant à la famille des STOPs. Nous avons également mis en évidence que cette famille de MAPs a la capacité de lier à la fois les MTs par leur domaine de liaison aux MTs et de lier l'appareil de Golgi par les cystéines de leur extrémité amino-terminale.

I – 2 Article

STOP-like Protein 21 Is a Novel Member of the STOP Family, Revealing a Golgi Localization of STOP Proteins*

Received for publication, April 10, 2006, and in revised form, July 5, 2006. Published, JBC Papers in Press, July 12, 2006, DOI 10.1074/jbc.M603380200

Sylvie Gory-Fauré[‡], Vanessa Windscheid[‡], Christophe Bosc[‡], Leticia Peris[‡], Dominique Proietto[‡], Ronald Franck[§], Eric Denarier[‡], Didier Job[‡], and Annie Andrieux^{‡1}

From [‡]INSERM U366, Département Recherche et Dynamique Cellulaire/Cytosquelette, Commissariat à l'Energie Atomique Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, cedex 9, France and [§]AG Molecular Recognition, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig, Germany

Neuronal microtubules are stabilized by two calmodulin-regulated microtubule-associated proteins, E-STOP and N-STOP, which when suppressed in mice induce severe synaptic and behavioral deficits. Here we show that mature neurons also contain a 21-kDa STOP-like protein, SL21, which shares calmodulin-binding and microtubule-stabilizing homology domains with STOP proteins. Accordingly, in different biochemical or cellular assays, SL21 has calmodulin binding and microtubule stabilizing activity. However, in cultured hippocampal neurons, SL21 antibodies principally stain the somatic Golgi and punctate Golgi material in neurites. In cycling cells, transfected SL21 decorates microtubules when expressed at high levels but is otherwise principally visible at the Golgi. The Golgi targeting of SL21 depends on the presence of cysteine residues located within the SL21 N-terminal domain, suggesting that Golgi targeting may require SL21 palmitoylation. Accordingly we find that SL21 is palmitoylated *in vivo*. N-STOP and E-STOP, which contain the Golgi targeting sequences present in SL21, also display distinct Golgi staining when expressed at low level in cycling cells. Thus neuronal proteins of the STOP family have the capacity to associate with Golgi material, which could be important for STOP synaptic functions.

Neurons contain abundant subpopulations of stable microtubules that resist depolymerizing conditions such as exposure to the cold. This property is due to microtubule association with E- and N-STOP², two neuronal calmodulin-binding and calmodulin-regulated proteins (1–3). STOP proteins are important for synaptic function and STOP null mice present defects in both short- and long-term synaptic plasticity, associated with severe behavioral and neurotrans-

mitter deficits (1, 4). At the ultrastructural level, the main signature of STOP suppression is a dramatic depletion of synaptic vesicle pools in glutamatergic neurons.

E- and N-STOP arise from mRNA splicing of a single gene (5). These STOP proteins contain modular motifs (3) that are either bifunctional (calmodulin-binding and microtubule-stabilizing sequences, Mc and Mn modules, respectively) or are comprised of calmodulin-binding sequences, unrelated to microtubule-stabilizing sequences.

We have previously described a number of STOP splicing variants, which are principally present in non-neuronal cells (6), but for a long time, STOPs seemed to be unique with no STOP-related proteins. However, strong evidence for a 21-kDa STOP-like protein (SL21) has arisen from data base searches (3). SL21 contains a 35-amino acid (aa) N-terminal stretch that shares 83% homology with the N-terminal part of E- or N-STOP and contains a calmodulin-binding motif. A second domain of SL21, spanning 24 aa, shares 71% homology with a microtubule-stabilizing Mn module of E- and N-STOP (3, 7).

Here, we demonstrate that SL21 is a neuronal protein, strictly expressed in the postnatal brain. We show that SL21 has microtubule stabilizing activity similar to E- and N-STOP. However, surprisingly, endogenous SL21 co-localizes with the somatic Golgi apparatus and with dendritic Golgi structures in cultured hippocampal neurons. We show that the N-terminal part of SL21 comprises a Golgi-targeting sequence with critical cysteine residues, which sustain SL21 palmitoylation. The SL21 Golgi targeting sequence is also present and functional in E- and N-STOP. Thus, in light of studies indicating that the presence of Golgi material in neurites and synapses may be important for synaptic plasticity (8), Golgi interactions with STOP could be important for STOP function in synapses.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Sequence Analysis—Mouse N-STOP protein sequence (GenBankTM accession number CAA75930) was submitted to the BLAST program to identify STOP-related proteins. GenBankTM accession numbers of these proteins are CAA63762 for rat N-STOP, NP_149052 for human N-STOP, XP_508647 for chimpanzee N-STOP, XP_596995 for cow N-STOP, NP_941001 for mouse SL21, XP_344040 for rat SL21, AAH06434 for human SL21, XP_516902 for chimpanzee SL21, and XP_608343 for cow SL21. Protein sequence

* This work was supported by grants from La Ligue Nationale contre le Cancer (to D. J.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed: INSERM U366, DRDC/CS, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France. Tel.: 33-438-783-801; Fax: 33-438-785-057; E-mail: annie.andrieux@cea.fr.

² The abbreviations used are: STOP, stable tubule only polypeptide; SL21, 21-kDa STOP-like protein; aa, amino acid(s); DIV, days (of differentiation) *in vitro*; mAb, monoclonal antibody; GST, glutathione S-transferase; PBS, phosphate-buffered saline; Pipes, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium.

Golgi Localization of STOP

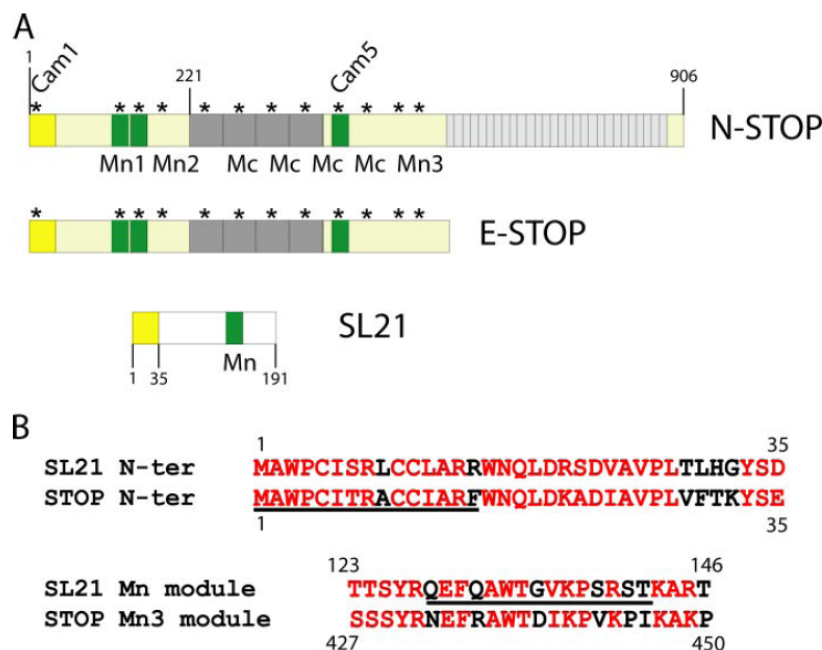


FIGURE 1. STOPs and SL21 conserved domains. A, schematic representations of mouse N-STOP, E-STOP, and SL21. Calmodulin-binding sites (asterisks) and microtubule-stabilizing modules Mn and Mc (green and dark gray, respectively) are represented on E- and N-STOP proteins. Calmodulin-binding sites Cam1 and Cam5 are indicated. N-STOP C-terminal repeats, absent in E-STOP, are shown in light gray. The common N-terminal domain is in yellow. B, alignment of SL21 and STOP conserved N-terminal sequences (top) and of conserved Mn module (bottom). Conserved amino acids are shown in red. The N-STOP calmodulin-binding sequences Cam1 and Cam5 are underlined. Numbers correspond to aa position in mouse SL21 and N-STOP proteins.

alignments were performed using the multiple alignment software ClustalW (9).

Plasmid Constructs—On the basis of the mouse SL21 cDNA sequence (GenBankTM accession number BY727771), the entire open reading frame of mouse SL21 was amplified by PCR. We used mouse brain Marathon Ready cDNA (BD Biosciences) and the Advantage-GC2 polymerase mix (BD Biosciences) with primers containing BglII extensions. The resulting PCR product was first cloned into pCR2.1-TOPO (Invitrogen). For expression in mammalian cells, the complete coding sequence was cloned in pSG5 vector (Stratagene) and in pcDNA3.1(-)/Myc-His-A vector (Invitrogen) to be fused with the *myc* epitope DNA. For production and purification in the bacterial system, the complete coding sequence was cloned into pGex-4T3 vector (Amersham Biosciences) to fuse GST after the last amino acids of SL21. The two SL21 deletion mutants, obtained by PCR, correspond to Met + aa 35–191 (SL21Δ2–34) and to aa 1–122 + aa 146–191 (SL21ΔMn3) according to the numbering of mouse SL21 protein. The replacement of Cys⁵, Cys¹⁰, and Cys¹¹ by glycine residues (SL21-C(5/10/11)G) was obtained by PCR, with a degenerate 5′-oligonucleotide (5′-AgA TCT ATg gCg Tgg CCC ggC ATC AgC Cgg CTA ggC ggC CTg gCC-3′). The STOP coding sequence of LntΔMn1Mn2, corresponding to aa 1–123 + Ala + aa 139–161 + Ile-Gln + aa 175–225 according to the numbering of rat N-STOP, was amplified by PCR and then subcloned into the pcDNA3.1(-)/Myc-His-A vector to be fused with the *myc* epitope DNA. N-STOP plasmid was described previously (2, 10). The STOP coding sequence of

N-STOPΔ2–19, corresponding to Met + aa 20–952 according to the numbering of rat N-STOP, was amplified by PCR and then subcloned into the pSG5 vector. All of the SL21 and STOP constructs were confirmed by DNA sequencing.

Production of SL21-GST—Plasmid pGex-4T3 containing SL21 cDNA was transformed in One Shot BL21 (DEA3) Star cells (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Transformed cells expressing SL21-GST were grown at 37 °C to an A_{600} of 0.6, and induced with 0.5 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside for 3 h at 37 °C. Cells were pelleted, resuspended in PBS containing 1% Triton X-100, protease inhibitors (Complete Mixture tablets, Roche Applied Science), and sonicated for 1.5 min before centrifugation (17,000 × *g* for 10 min). The supernatant was incubated with glutathione-Sepharose beads. These beads were placed in columns and successively washed with PBS containing 1% Triton X-100, then with PBS,

and finally with 50 mM Tris, pH 8.0. The GST fusion proteins were eluted with 10 mM glutathione in 50 mM Tris, pH 8.0.

Western Blot Analysis—Tissues from mice were homogenized in a 100 mM K-Pipes, 1 mM EGTA, and 1 mM MgCl₂ buffer, pH 6.65. The homogenates were centrifuged at 200,000 × *g* for 30 min at 4 °C. Supernatants were then harvested and analyzed by SDS-PAGE (11). For immunoblotting, proteins were subsequently transferred onto nitrocellulose membranes and processed as described previously (12).

Sedimentation of Proteins with Microtubules—All proteins were preclarified at 150,000 × *g* for 15 min in a TL-100 Ultracentrifuge at 4 °C prior to the start of experiments. STOP proteins were purified as described in Pirollet *et al.* (13). A microtubule-binding assay was performed as in Masson and Kreis (14) using taxol-stabilized microtubules (4 μM) as substrates and a 60% glycerol cushion.

Assay of Calmodulin Binding to Immobilized Peptide—Immobilized peptide arrays corresponding to the human SL21 were produced according to Frank (15) with an ABIMED ASP 222 automated SPOT robot. The protein sequence was subdivided into 15-mer peptides with an overlap of 12 aa. The peptides were synthesized spotwise as an array on a specially manufactured cellulose membrane (AIMS Scientific Products GmbH, Braunschweig, Germany). The peptides are permanently linked to the membrane through their carboxyl terminal aa via a polyethylene glycol spacer. The synthesis procedure followed exactly that of Frank and Overwin (16). Overlay binding assay were performed as described elsewhere (3), using ³⁵S-labeled calmodulin.

Cell Culture—Hippocampal cell cultures were prepared as described previously (17). Briefly, hippocampi brain tissue from E18.5 (embryonic day 18.5) mice were removed and digested in 0.25% trypsin in Hepes-buffered Hanks' balanced salt solution at 37 °C for 15 min. After manual dissociation, cells were plated at a concentration of 5,000–15,000 cells/cm² on poly-L-lysine (Sigma)-coated coverslips, in DMEM-10% fetal bovine serum. One hour after plating, the medium was changed to DMEM containing B27 and N2 supplements (Invitrogen). HeLa and NIH 3T3 cells were cultured in RPMI-Glutamax or DMEM-Glutamax supplement, respectively, with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen).

Transient Transfection and Analysis of Microtubule Stability—Exponentially growing HeLa or NIH 3T3 cells were transfected with the cDNAs described above using FuGENE 6 (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were either directly processed for immunofluorescence or exposed to cold temperatures (30 min on ice) or to nocodazole (20 μ M for 30 min). Cells were then permeabilized in lysis buffer (30 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% Triton X-100, pH 6.75) for 1 min and processed for immunofluorescence.

Antibodies—Primary antibodies were: mAb against α -tubulin (TUB2.1) diluted to 1/100 (Sigma); rat mAb against tyrosinated tubulin (YL1/2) diluted to 1/5,000 (18); mAb against GM130 diluted to 1/50 and against GS28 diluted to 1/200 (BD Transduction Laboratories); rabbit polyclonal antibody against giantin (Covance) diluted to 1/2,000; rabbit polyclonal antibody 23C against STOP (2) diluted to 1/400. Rabbit polyclonal antibodies 3315 were raised against synthetic peptide FQVPEVRK-FTPNPSAI, corresponding to aa 164–179 of mouse SL21 (Eurogentec). Serum 3315 was affinity-purified with the corresponding peptide and used diluted to 1/4000 and to 1/400 for Western blot and immunofluorescence analysis, respectively.

Secondary antibodies were: anti GST peroxidase-coupled (Santa Cruz); anti-mouse Alexa 488 (Molecular probes)- or Cy5-coupled antibodies, anti-rabbit Cy3-coupled antibodies, and anti-rat Alexa 488-coupled (Jackson ImmunoResearch) antibodies.

Immunofluorescence—Hippocampal neurons were then either permeabilized in OPT buffer (80 mM Pipes, pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 10% glycerol) at 35 °C for 2 min before fixation or were fixed directly for 10 min in methanol at –20 °C. Cells were then incubated with primary antibodies for 45 min in PBS-Tween 0.5% and with secondary antibodies for 40 min. Cells were analyzed with a laser confocal microscope (TCS-SP2, Leica) or with an inverted microscope Axioscop 50 (Zeiss) controlled by Metaview (Universal Imaging, Downingtown, PA). Images were digitalized using a Cool-snap ES camera (Roper Scientific).

[³H]Palmitate Labeling and Immunoprecipitation—HeLa cells were either nontransfected or transfected with SL21-myc or SL21 C(5/10/11)G-myc cDNAs. One day after transfection, cells were labeled for 3 h with 500 μ Ci of [³H]palmitic acid (Amersham Biosciences). The radioactive palmitic acid was completely dried under nitrogen, resuspended in 12.5 μ l of Me₂SO, and complemented with 1 ml of RPMI containing 0.5% defatted bovine serum albumin (Sigma). Cells were washed and

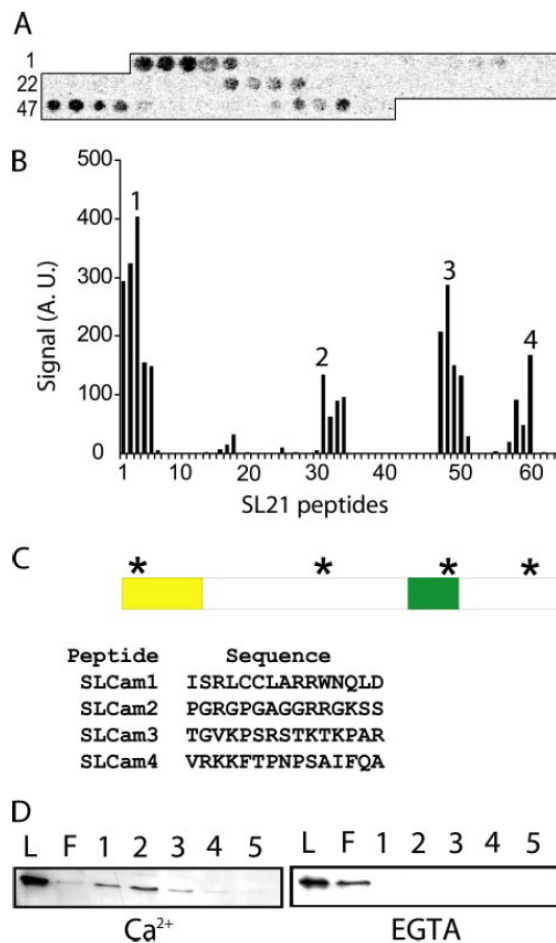
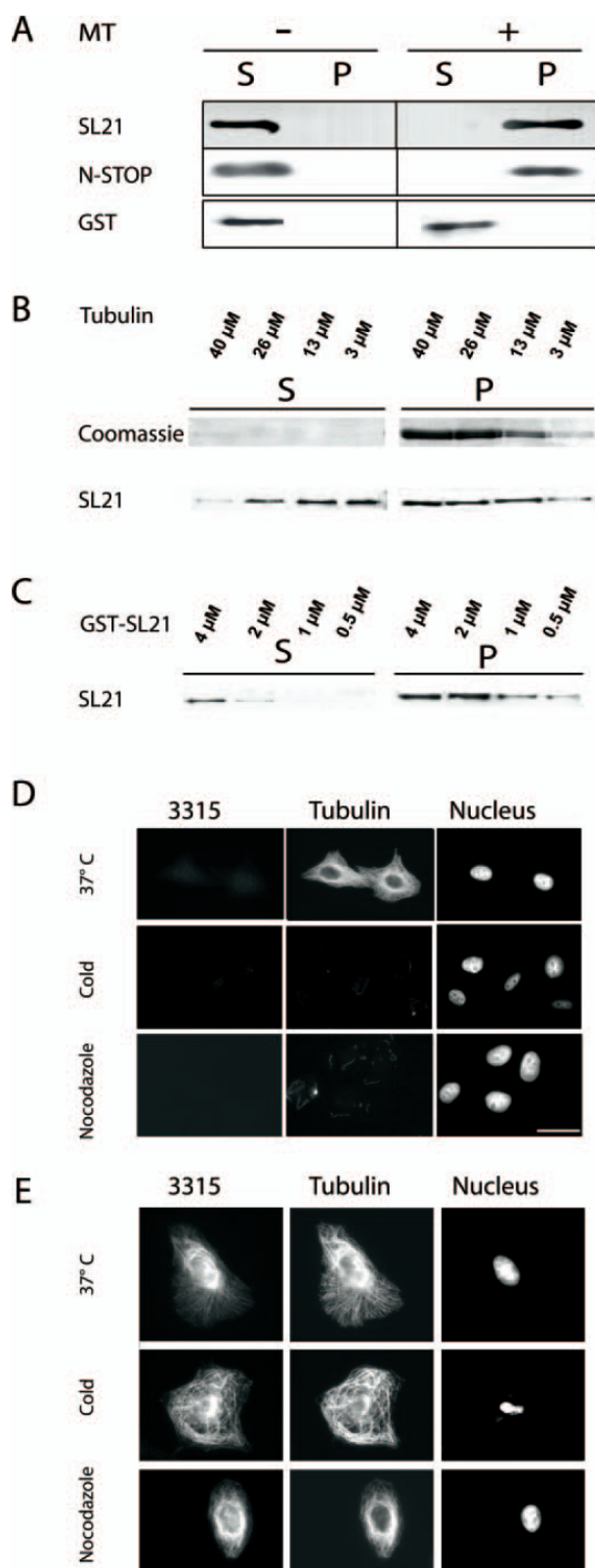


FIGURE 2. Calmodulin-binding properties of SL21. SL21 calmodulin-binding motifs are identified using immobilized peptide array and calmodulin-agarose binding of SL21. **A**, ³⁵S-labeled calmodulin overlay of a membrane containing SL21 immobilized peptide array. The overlapping peptides (15-mers, with an overlap of 12 aa) were numbered from the amino-terminal to the carboxyl-terminal residues of SL21. Numbers correspond to the first peptide of each line. Four peptide clusters interacting with ³⁵S-labeled calmodulin were detected by autoradiography. **B**, quantitative analysis of [³⁵S]calmodulin binding to mouse SL21 peptides. The radioactive signals observed in **A** were quantified using a phosphorimaging device, and results were plotted. Signal values are in arbitrary units (A.U.). The four peaks of maximum radioactivity signal correspond to SL21 aa 6–20 (peak 1), aa 87–101 (peak 2), aa 141–155 (peak 3), and aa 177–191 (peak 4). **C**, calmodulin-binding sites SLCam1 to SLCam4, corresponding to peaks 1–4 in **B**, are reported on the schematic representation of SL21 (asterisks), and their sequences are given. **D**, binding of SL21-GST to immobilized calmodulin-agarose. Recombinant SL21-GST was produced in bacteria and loaded onto a calmodulin-agarose column in the presence (left panel) or absence (right panel) of 1 mM Ca²⁺. The column was washed, and proteins were subsequently eluted with EGTA-containing buffer. Equal aliquots of the loaded sample (L), flow-through fraction (F), and EGTA elution fractions 1–5 were analyzed for SL21-GST content using SDS-PAGE followed by immunoblot analysis with SL21 polyclonal antibody 3315.

scraped with PBS. After centrifugation at 12,000 \times g for 2 min, cells were lysed in IP buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% deoxycholate, 1% Triton X-100, 10% glycerol, pH 8.0) in the presence of protease inhibitors (Complete Mixture tablets, Roche Applied Science) and 5 mM CaCl₂. After centrifugation of the cell lysate at 12,000 \times g for 5 min at 4 °C, the supernatant was supplemented with 5 mM EGTA and incubated for 2 h at 4 °C

Golgi Localization of STOP



with 25 μ l of *myc* antibody (Santa Cruz Biotechnology) preincubated for 2 h at 4 $^{\circ}$ C with 30 μ l of protein G-Sepharose (Amersham Biosciences). After centrifugation at 12,000 \times *g* for 2 min, the immunoprecipitates were washed five times in IP buffer for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. Samples were separated by SDS-PAGE, and gels were fixed for 30 min in 50% methanol-10% acetic acid and then treated for 30 min with Amplify solution (Amersham Biosciences) to improve the radioactive signal. The gels were dried and exposed on autoradiographic films for 10 days at -80 $^{\circ}$ C.

RESULTS

STOP Homology Domains in SL21—E- and N-STOP contains two classes of bifunctional calmodulin-binding (Mc) and -stabilizing modules (Mn) (Fig. 1A). E- and N-STOP also contain additional calmodulin-binding sequences unrelated to Mn or Mc modules (Fig. 1A). The first 35 aa of SL21 share 83% homology with the N-terminal aa of E- and N-STOP, which comprises, in STOPS, the functional calmodulin-binding motif called Cam1 (3). A second domain of SL21, spanning 24 aa, shares 71% homology with the E- and N-STOP bifunctional calmodulin-binding (Cam5) and microtubule-stabilizing Mn3 module (3). The homologous domains of N-STOP and SL21 are aligned (Fig. 1B).

Calmodulin-binding Properties of SL21—All of the STOP calmodulin-binding sites including Cam1 and Cam5 were initially identified as calmodulin-binding motifs on N-STOP immobilized peptide arrays (3). A similar assay with SL21 peptides (Fig. 2, A and B) showed that the STOP Cam1 and Cam5 homologous motifs of SL21 (SL-Cam1 and SL-Cam3, respectively), also bound [35 S]calmodulin (Fig. 2, B and C, peaks 1 and 3) together with two other apparently weaker calmodulin-binding motifs, SL-Cam2 and SL-Cam4, peaks 2 and 4 respectively (Fig. 2, B and C).

Calmodulin-binding motifs in N-STOP have been shown to bind to immobilized Ca^{2+} -calmodulin *in vitro* (3). Accordingly, four independent experiments consistently showed that recombinant SL21-GST bound to calmodulin column, as illus-

FIGURE 3. Microtubule-binding and -stabilizing activity of SL21. A–C, microtubule co-sedimentation assays. A, co-sedimentation of SL21-GST, N-STOP, and GST with taxol-stabilized microtubules (10 μ M). SL21-GST, N-STOP, and GST were incubated with (+) or without (–) taxol-stabilized microtubules (MT). The samples were then sedimented through a 60% glycerol cushion. The supernatants (S) and pellets (P) were analyzed for SL21, N-STOP, and GST content by immunoblot using SL21 polyclonal antibody 3315, N-STOP polyclonal antibody 23C, and GST antibody, respectively. B, various amounts of tubulin (3, 13, 26, and 40 μ M) were polymerized, mixed with SL21-GST (2 μ M), and centrifuged. Equal amounts of supernatant and pellets, separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue, showed no detectable amount of tubulin in the supernatant. The supernatants and pellets were analyzed for SL21 content by immunoblot using SL21 polyclonal antibody 3315. C, various amounts of SL21 (4, 2, 1, and 0.5 μ M) were incubated with polymerized tubulin (10 μ M). After centrifugation, equal amounts of supernatants and pellets were separated by SDS-PAGE and analyzed for SL21 content by immunoblot using SL21 polyclonal antibody 3315. D and E, microtubule stability in cells. HeLa cells were either non-transfected (D) or transfected with a cDNA encoding SL21 mutant lacking the N-terminal domain and containing the Mn module (SL21 Δ 2–34) (E). After 24 h, cells were either maintained at 37 $^{\circ}$ C, exposed to 4 $^{\circ}$ C, or treated with 20 μ M nocodazole for 30 min. Cells were then double-stained for microtubules (α -tubulin mAb) and for SL21 Δ 2–34 (SL21 polyclonal antibody 3315). Bar, 10 μ m.

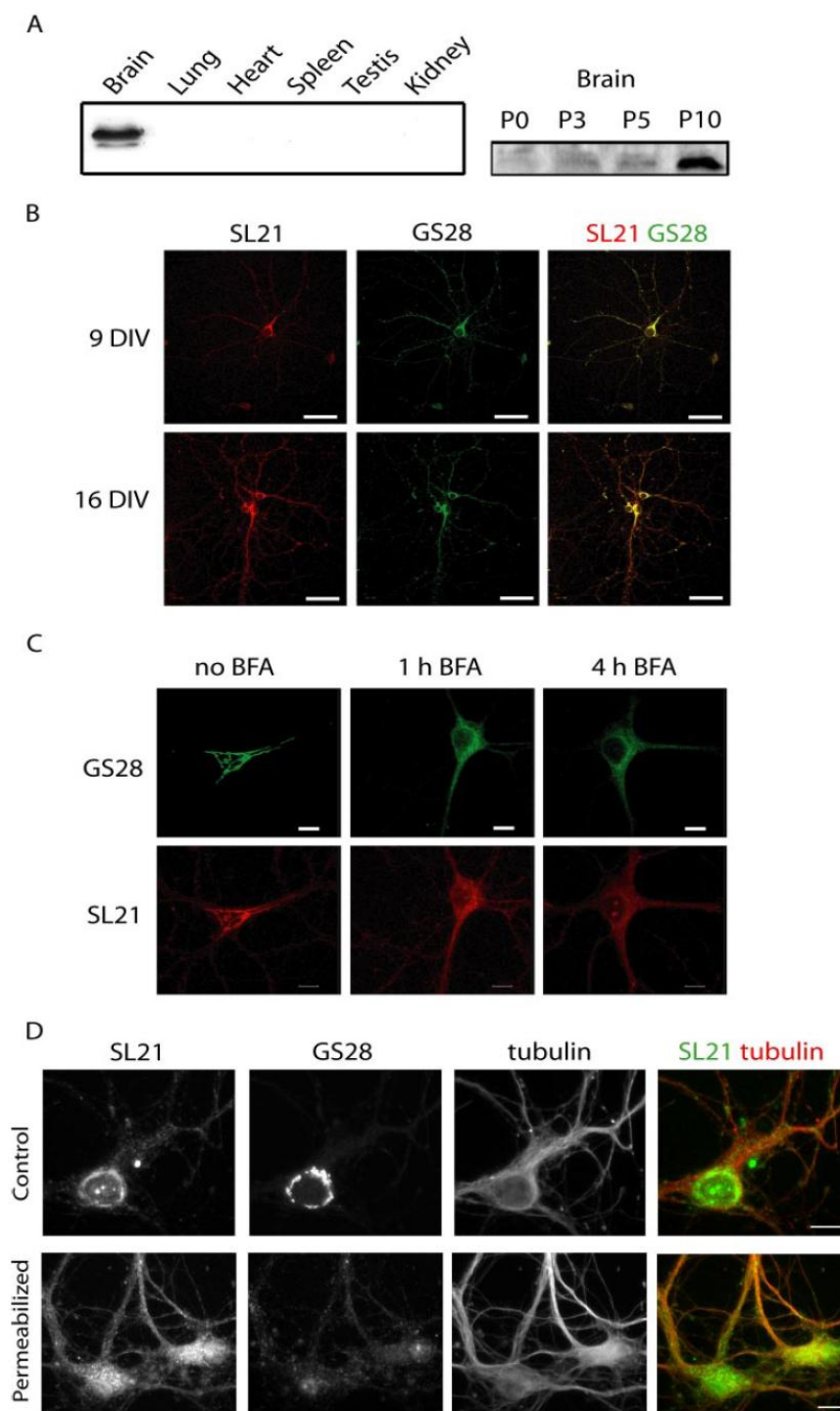
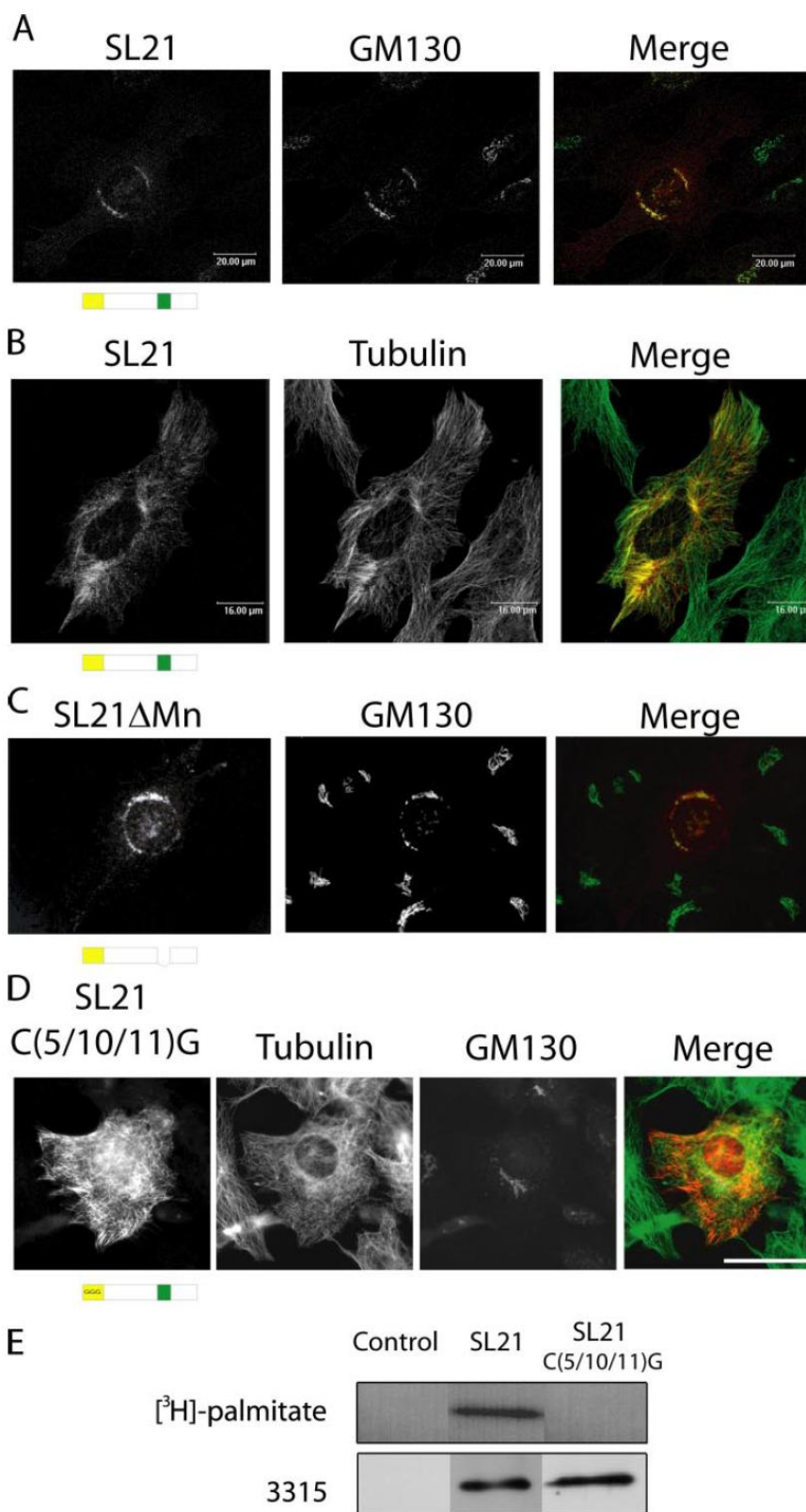


FIGURE 4. Tissue distribution and cellular localization of SL21. *A*, immunoblot analysis of adult mouse tissues and postnatal brain (P0–P10) using SL21 polyclonal antibody 3315. *B*, distribution of SL21 protein in cultured mouse hippocampal neurons after 9 or 16 days of differentiation *in vitro*. Double staining of SL21 and Golgi was performed using SL21 polyclonal antibody 3315 and monoclonal antibody GS28. Images were acquired using laser confocal microscopy. Bar, 40 μ m. *C*, Golgi-dependent localization of SL21. Hippocampal neurons, after 9 DIV were either untreated or treated with brefeldin A (10 μ g/ml) for 1 or 4 h. SL21 and Golgi stainings and image acquisition were as described in *B*. *D*, distribution of SL21 protein in cultured mouse hippocampal neurons (9 DIV) after permeabilization of the cells. Triple staining of SL21, microtubules, and Golgi was performed using SL21 polyclonal antibody 3315, anti α -tubulin, and GS28 monoclonal antibodies. After Triton-soluble protein extraction, SL21 staining was observed on microtubule network. Bar, 8 μ m.

Golgi Localization of STOP



trated in Fig. 2D. The binding was strictly dependent on the presence of calcium as shown by the release of SL21 from the calmodulin column by EGTA buffer (Fig. 2D) and by the non-binding of SL21 to calmodulin column in the absence of calcium (Fig. 2D). The binding of SL21-GST to calmodulin is mediated by SL21, as GST alone was unable to bind to immobilized calmodulin (data not shown). Thus, SL21 behaves as a *bona fide* calmodulin-binding protein *in vitro*.

Microtubule Binding and Stabilizing Activity of SL21—In E- and N-STOP, Mn modules mediate STOP association with microtubules with resulting inhibition of microtubule depolymerization upon exposure to the cold or to nocodazole (3). In agreement with the presence of an Mn module sequence in SL21, SL21 co-sedimented with taxol-stabilized microtubules in standard microtubule binding assays while remaining in the soluble fraction in the absence of microtubules (Fig. 3A). In the same microtubule binding assay, N-STOP co-sedimented with microtubules, whereas GST remained in the supernatant. In quantitative experiments, various amount of tubulin were polymerized and then incubated with SL21-GST at 2 μ M. Then, polymerized tubulin was pelleted, and SL21 content was analyzed on immunoblots, in both supernatants and pellets (Fig. 3B). The concentrations of tubulin at which approximately half of SL21 co-sedimented with microtubules was ~ 5 μ M (Fig. 3B). In additional experiments, SL21-GST at various concentrations was mixed with polymerized tubulin (10 μ M). Then, microtubules were pelleted, and SL21 content was analyzed on immunoblots in both supernatants and pellets (Fig. 3C). In this experiment, SL21 at 4 μ M was found both in the supernatant and in the pellet, whereas at concentration of SL21, ranging from 2 to 0.5 μ M, SL21 was only found associated with microtubules. Altogether these results showed that SL21 behaves as a microtubule-binding protein *in vitro*.

We used HeLa cells for microtubule-binding and -stabilization tests *in vivo*. HeLa cells are devoid of STOP, of SL21, and of cold-stable or nocodazole-resistant microtubules (Fig. 3D). When transfected in HeLa cells, a SL21 mutant (SL21 Δ 2–34) lacking the N-terminal domain and containing the Mn module decorated cytoplasmic microtubules and induced both microtubule cold stability and microtubule resistance to nocodazole (Fig. 3E), compatible with the functionality of the Mn module of SL21 *in vivo*. As shown below, the behavior of the full-length SL21 in cells was more complex than the mutant lacking the N-terminal domain (SL21 Δ 2–34) due to the interfering influence of the N-terminal sequence.

Tissue Distribution and Cellular Localization of Endogenous SL21—We used Western blot analysis of mouse tissues with SL21 polyclonal antibody 3315 to determine the distribution

pattern of SL21. SL21 was only detected in brain tissue (Fig. 4A). In tissue extracts from newborn brain, SL21 expression was low at P0 and increased after P10 (Fig. 4A). We then tested the presence of SL21 in various neuronal cell lines, using both immunoblot analysis and immunofluorescence microscopy. SL21 was not detected in neuronal cell lines (N2A, PC12, and NG108) whether cultured in the presence or absence of nerve growth factor (data not shown). In contrast, SL21 was present in neurons in primary cultures but absent from glial cells (data not shown). Interestingly, in differentiating hippocampal cultured neurons, SL21 antibodies principally stained a juxta-nuclear structure corresponding to the somatic Golgi apparatus, as demonstrated by co-localization with the cis-Golgi marker GS28 (Fig. 4B). At late stages of neuronal differentiation *in vitro* (16 DIV), in addition to the somatic Golgi, both SL21 and GS28 antibodies yielded a punctuated staining of neuritic extensions (Fig. 4B), corresponding to staining of neurite vesicular Golgi (19). A distinct microtubule staining was also visible after Triton-soluble protein extraction (Fig. 4D). Disruption of the somatic Golgi with brefeldin A treatment in differentiated neurons induced a dramatic redistribution of SL21 and GS28 stainings, both of which became diffuse (Fig. 4C). These results indicate that SL21 is specifically expressed in differentiated neuronal cells and that it localizes to microtubules, to the somatic Golgi, and to Golgi material traveling throughout neurites.

Dual Localization of Transfected SL21 in NIH 3T3 Cells Resulting from Microtubule- and Golgi-targeting Sequences in SL21—We used NIH 3T3 cells, which have a well organized somatic Golgi, and SL21 mutants for further analysis of SL21 localization and domain structure. When expressed in NIH 3T3 cells, the apparent localization of SL21 varied as a function of its expression level. At low levels of expression, SL21 was principally detectable on the Golgi (Fig. 5A). At higher levels of expression, there was also distinct SL21 staining of cytoplasmic microtubules (Fig. 5B). The deletion of the Mn module (SL21 Δ Mn) suppressed the microtubule association of SL21 at all expression levels, while preserving Golgi localization (Fig. 5C). Conversely, at all levels of expression in NIH 3T3 cells, a deletion mutant of SL21 lacking 34 N-terminal amino acids (SL21 Δ 2–34) associated with microtubules (data not shown), as in the case of HeLa cells (Fig. 3F), with no Golgi localization. In additional microtubule stabilization assays in HeLa cells, we found that native SL21 expressed at high levels and the SL21 Δ 2–34 deletion mutant had microtubule stabilizing activity, whereas the SL21 mutant SL21 Δ Mn, which showed exclusive Golgi localization, had no detectable effect on microtubule stability (not shown). Altogether, these results indicate that the targeting of SL21 to microtubules depends on the pres-

FIGURE 5. Golgi versus microtubule localization of SL21 and SL21 mutants in transfected cells. A and B, NIH 3T3 cells transfected with a cDNA encoding the complete form of SL21. Double immunofluorescence analysis was performed using SL21 polyclonal antibody 3315 and either GM130 mAb for Golgi staining (A) or α -tubulin mAb for microtubule staining (B). Cells expressed either low (A) or high levels (B) of SL21. All of the image acquisitions and merges were performed using laser confocal microscopy. C, NIH 3T3 cells transfected with a cDNA encoding SL21 Δ Mn and double-stained for Golgi (GM130 mAb) and for SL21 Δ Mn (SL21 polyclonal antibody 3315). D, NIH 3T3 cells transfected with a cDNA encoding SL21-C(5/10/11)G and triple-stained for microtubules (YL1/2 mAb), Golgi (GM130 mAb), and SL21 (SL21 polyclonal antibody 3315). Bar, 20 μ m (A, C, and D) and 16 μ m (B). Schematic representations of proteins are as described in Fig. 1A. E, incorporation of [3 H]palmitate into SL21-myc and SL21-C(5/10/11)G-myc mutant. HeLa cells overexpressing SL21-myc or SL21-C(5/10/11)G-myc mutant were incubated with [3 H]palmitate, and proteins were immunoprecipitated with anti-myc antibody. Immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to autoradiography or Western blot using SL21 polyclonal antibody 3315. Untransfected cells were used as control.

ence of the Mn module and that SL21 comprises a Golgi-targeting sequence located in the N-terminal domain of the protein.

Palmitoylation of SL21—Palmitoylation is often required for protein association with membranes and has been observed previously in neuronal proteins associated with tubulin and with the Golgi, such as SCG10 (20). Palmitoylation occurs at cysteine residues surrounded with basic residues (21). Mouse SL21 contains three cysteine residues, all located in the Golgi-targeting domain (positions 5, 10 and 11) and surrounded by basic residues (Fig. 6A). To assess whether these cysteines were involved in the localization of SL21 to the Golgi apparatus, we produced cDNAs encoding SL21 mutants in which Cys⁵, Cys¹⁰, and Cys¹¹ were replaced by glycine residues. These constructs were then transfected in NIH 3T3 cells, and the Golgi localization of the mutants was examined. In contrast to SL21, which localizes to the Golgi, the SL21 mutant where all the three cysteine residues were replaced (SL21-C(5/10/11)G), did not localize to the Golgi but co-localized with microtubules (Fig. 5D). These results indicate a requirement of SL21 N-terminal Cys⁵, Cys¹⁰, and Cys¹¹ for proper localization of SL21 to Golgi apparatus. To test SL21 palmitoylation directly, HeLa cells were incubated with [³H]palmitate with or without prior transfection with SL21-*myc* or SL21-C(5/10/11)G-*myc* cDNA. Then, SL21-*myc* and SL21-C(5/10/11)G-*myc* were immunoprecipitated from cell extracts, and the immunoprecipitated proteins were analyzed both by Western blot, using SL21 polyclonal antibody 3315, and by autoradiography (Fig. 5E). As shown in Fig. 5E, SL21 incorporated ³H, whereas SL21-C(5/10/11)G mutant did not, demonstrating that SL21 is indeed palmitoylated in cells and showing the crucial role of Cys⁵, Cys¹⁰, and Cys¹¹ in this process. These results were obtained for three independent experiments, and similar results were observed when using SL21-GFP instead of SL21-*myc* (data not shown).

Golgi Targeting of N-STOP—The N-terminal Golgi-targeting sequence of SL21, which is conserved among mammals, is also present at the N terminus of N-STOP (Fig. 6A). Accordingly, a 225-aa N-terminal fragment of N-STOP containing the Golgi-targeting sequence and deleted for microtubule-binding modules Mn1 and Mn2 (LNTΔMn1Mn2) was uniformly addressed to the Golgi when transfected in NIH 3T3 cells (Fig. 6B). Despite the presence of such a functional Golgi-targeting sequence at their N terminus, E- and N-STOP have not been detected at the Golgi in previous studies, which could be due either to a dominant influence of the STOP microtubule-targeting sequences (Mn and Mc modules) or to unfavorable experimental procedures. To test these possibilities, we re-examined N-STOP localization in various cell types and conditions. In neurons, STOP antibody yielded a bright staining of the whole cell body, making a possible STOP localization at the Golgi difficult to detect (2). Interestingly, in NIH 3T3 cells,

transfected N-STOP staining was principally detectable at the Golgi at low levels of expression (Fig. 6C), with both Golgi and microtubule staining being present at high expression levels (Fig. 6D). Moreover, a transfected N-STOP mutant (N-STOPΔ2–19) lacking the Golgi targeting sequence failed to associate with the Golgi (Fig. 6E). Altogether, these results indicate that the ability to localize to Golgi material is a shared property of STOP and STOP-like proteins, because of the presence of a Golgi-targeting sequence in their shared N-terminal domain.

DISCUSSION

In this study, SL21 and neuronal STOPs (E-STOP and N-STOP) emerge as a class of microtubule- and calmodulin-binding proteins, sharing both a Golgi-targeting sequence and microtubule-stabilizing modules. We note that the STOP Golgi-targeting sequence is only present in E- and N-STOP and is absent from all of the other known STOP variants (6). As are E- and N-STOP, SL21 is specific to neurons, and both SL21 and N-STOP are expressed only in the postnatal brain. Despite such similarities in structure and activity, there is an apparent difference in the cellular distribution of endogenous SL21 and N-STOP in neurons, with SL21 preferentially associated with the somatic Golgi and N-STOP with microtubules. However both SL21 and N-STOP are detected principally at the Golgi when expressed at low levels in cells, whereas they are also visible on cytoplasmic microtubules at high levels of expression. The apparent differences between endogenous SL21 and N-STOP localization in neurons may thus reflect differences in expression levels, with N-STOP probably much more abundant than SL21. Superimposed cell regulations may also affect SL21 or STOP localization. The Golgi targeting of SL21 and of STOP most likely depends on palmitoylation, which is a regulated and reversible covalent protein modification (22, 23). Also, the microtubule binding activity of Mn modules can be inhibited by calmodulin (24) and, in the case of STOP, through phosphorylation, opening the possibility of a protein shift from microtubules to other cell compartments (25).

Why should neurons contain specific microtubule-associated proteins with Golgi binding activity? The somatic Golgi in neurons has an organization similar to that observed in non-neuronal cells, although the Golgi orients toward the longest dendrite, and this Golgi polarity precedes the asymmetric dendrite growth (26). Additionally there is evidence for the presence of Golgi material along neurites. Previous ultrastructural studies have reported membranes analogous to Golgi cisternae within the spines of distal dendrites (27, 28). Moreover many neurons possess both somatic Golgi and discrete, discontinuous Golgi-type structures ("Golgi outposts") located far into the dendrites. These Golgi outposts are mobile structures and are positioned to serve particular dendrites regions or sets of syn-

FIGURE 6. Golgi-targeting of the N-terminal domain of N-STOP. A, alignment of the N-terminal domains of STOP and SL21 proteins from various species as indicated. Amino acids conserved in N-STOP and SL21 are boxed in black. Among the strongly conserved amino acids, the cysteine residues 5, 10, and 11 are boxed in red. Numbers correspond to aa position. B, NIH 3T3 cells transfected with a cDNA encoding STOP fragment LNTΔMn1Mn2-*myc* and double-stained for Golgi (giantin polyclonal antibody) and LNTΔMn1Mn2 (myc mAb). C and D, NIH 3T3 cells transfected with a cDNA encoding N-STOP and expressing either low (C) or high levels (D) of N-STOP. Cells were double-stained for STOP (polyclonal antibody 23C) and for either Golgi (GM130 mAb) or microtubule (α-tubulin mAb). E, NIH 3T3 cells transfected with a cDNA encoding N-STOPΔ2–19 and double-stained for STOP (polyclonal antibody 23C) and microtubule (α-tubulin mAb). Schematic representations of proteins are as in Fig. 1A. Bar, 20 μm.

Golgi Localization of STOP

apses, where they may be important for synaptic plasticity (8, 19). The ability of Golgi binding may therefore be important for the function of N-STOP in synaptic plasticity (1). Additionally, palmitoylation may allow STOP interaction with vesicular or membrane material other than the Golgi (29) and may thereby be central to the dramatic effects of STOP suppression on the synaptic vesicle density (1). Moreover, palmitoylation has specifically been shown to play a role in neuronal protein trafficking and in the clustering of receptors and the associated scaffolding proteins at synapses (29, 30).

According to the present study, SL21 and STOP have extensively overlapping activities. Yet, STOP suppression is not compensated by SL21 in STOP-deficient mice, and we have not detected any obvious modification in SL21 expression (data not shown). What is the utility of SL21 in the presence of STOP? We have performed SL21 small interfering RNA (siRNA) experiments in hippocampal neurons, with inconclusive results (data not shown). It is likely that, as for N-STOP, SL21 function will be revealed by its suppression in whole animals, where complex aspects of synaptic function can be investigated. STOP or SL21 null animals may offer exciting models in which to test the role of the Golgi in integrated brain functions.

Acknowledgments—We thank A. Schweitzer and N. Collomb for technical assistance; Y. Saoudi for help in imaging; and Julien Fauré, Jacques Brocard, and J. C. Deloulme for helpful discussions.

REFERENCES

- Andrieux, A., Salin, P. A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., and Job, D. (2002) *Genes Dev.* **16**, 2350–2364
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechère, L., and Job, D. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 167–179
- Bosc, C., Frank, R., Denarier, E., Ronjat, M., Schweitzer, A., Wehland, J., and Job, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 30904–30913
- Brun, P., Bégou, M., Andrieux, A., Mouly-Badina, L., Clerget, M., Schweitzer, A., Scarna, H., Renaud, B., Job, D., and Suaud-Chagny, M. F. (2005) *J. Neurochem.* **94**, 63–73
- Denarier, E., Aguezoul, M., Jolly, C., Vourc'h, C., Roure, A., Andrieux, A., Bosc, C., and Job, D. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 791–796
- Galiano, M. R., Bosc, C., Schweitzer, A., Andrieux, A., Job, D., and Hallak, M. E. (2004) *J. Neurosci. Res.* **78**, 329–337
- Bosc, C., Andrieux, A., and Job, D. (2003) *Biochemistry* **42**, 12125–12132
- Horton, A. C., and Ehlers, M. D. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 585–591
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
- Bosc, C., Cronk, J. D., Pirollet, F., Watterson, D. M., Haiech, J., Job, D., and Margolis, R. L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2125–2130
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Lieuvin, A., Labbé, J. C., Dorée, M., and Job, D. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 985–996
- Pirollet, F., Derancourt, J., Haiech, J., Job, D., and Margolis, R. L. (1992) *Biochemistry* **31**, 8849–8855
- Masson, D., and Kreis, T. E. (1993) *J. Cell Biol.* **123**, 357–371
- Frank, R. (1992) *Tetrahedron* **48**, 9217–9232
- Frank, R., and Overwin, H. (1996) *Methods Mol. Biol.* **66**, 149–169
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A., and Banker, G. A. (1988) *J. Neurosci.* **8**, 1454–1468
- Wehland, J., and Willingham, M. C. (1983) *J. Cell Biol.* **97**, 1476–1490
- Horton, A. C., and Ehlers, M. D. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 6188–6199
- Di Paolo, G., Lutjens, R., Pelletier, V., Stimpson, S. A., Beuchat, M. H., Catsicas, S., and Grenningloh, G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5175–5182
- Resh, M. D. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1451**, 1–16
- Ross, E. M. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 107–109
- Mumby, S. M. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 148–154
- Job, D., Fischer, E. H., and Margolis, R. L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 4679–4682
- Baratier, J., Peris, L., Brocard, J., Gory-Faure, S., Dufour, F., Bosc, C., Fourrest-Lieuvin, A., Blanchoin, L., Salin, P., Job, D., and Andrieux, A. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 19561–19569
- Horton, A. C., Racz, B., Monson, E. E., Lin, A. L., Weinberg, R. J., and Ehlers, M. D. (2005) *Neuron* **48**, 757–771
- Pierce, J. P., van Leyen, K., and McCarthy, J. B. (2000) *Nat. Neurosci.* **3**, 311–313
- Pierce, J. P., Mayer, T., and McCarthy, J. B. (2001) *Curr. Biol.* **11**, 351–355
- el-Husseini Ael, D., and Bredt, D. S. (2002) *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 791–802
- Huang, K., and El-Husseini, A. (2005) *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 527–535

II - Résultats complémentaires

II – 1 Palmitoylation des protéines SL21 et N-STOP

II – 1-1 Inhibition de la palmitoylation de SL21 par le 2-bromopalmitate

Nous avons montré, précédemment, que SL21 (SL^{CCC}) est palmitoylable alors que son triple mutant cystéine (SL^{GGG}) ne l'est pas (Gory-Fauré *et al.*, 2006). Nous avons poursuivi l'étude en réalisant un test de palmitoylation en présence de 2-bromopalmitate (2-BP), analogue structurale de l'acide palmitique bloquant le transfert du palmitate sur la protéine, afin de vérifier qu'on inhibait bien la palmitoylation de SL21 (Webb *et al.*, 1999). Les cellules COS-7 exprimant SL21 sauvage ou son triple mutant cystéine sont pré-incubées avec du 2-BP, puis sont mises en présence de palmitate tritié. Les protéines SL^{CCC}-Myc et SL^{GGG}-Myc sont ensuite immunoprécipitées. Les différentes fractions immunoprécipitées sont analysées, d'une part, par Western-Blot pour vérifier l'immunoprécipitation de SL21 ou de son mutant et d'autre part, par autoradiographie pour mesurer l'incorporation de palmitate tritié (Figure 38).

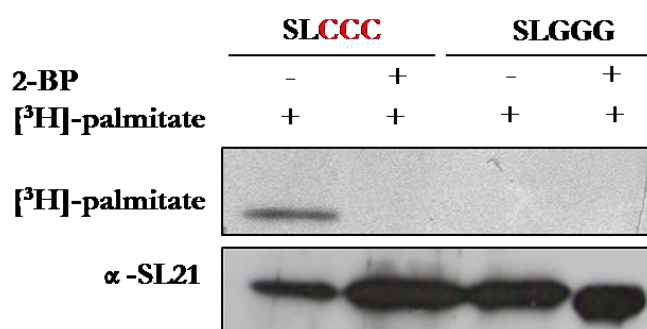


Figure 38 : Inhibition de la palmitoylation des protéines SL21 par le 2-bromopalmitate. Les cellules COS-7 sont transfectées avec des plasmides codant soit pour SL21 sauvage fusionnée à la protéine Myc (SL^{CCC}) soit pour SL21 mutée sur ces trois résidus cystéines étiquetée Myc (SL^{GGG}). Les cellules sont traitées au 2-bromopalmitate (2-BP) puis sont incubées en présence de palmitate tritiée. Les protéines sont ensuite immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps anti-Myc. Enfin, les fractions immunoprécipitées sont analysées par Western-Blot à l'aide de l'anticorps polyclonal dirigé contre SL21 (α-SL21) et par autoradiographie ([³H]-palmitate).

SL21 n'est plus palmitoylable en présence de 2-BP alors que de l'acide palmitique est bien ajouté au niveau des cystéines de SL21 en l'absence de 2-BP (Figure 38). SL21 mutée sur ces trois cystéines n'est pas palmitoylable en présence ou en absence de 2-BP. Nous confirmons donc que les trois cystéines de SL21 sont les cibles de la palmitoylation.

II – 1-2 Localisation de SL21 en présence de 2-bromopalmitate

Nous avons également montré que la mutation des trois cystéines en résidus glycine entraîne une délocalisation de SL21 (Gory-Fauré *et al.*, 2006). Nous avons alors regardé si le 2-bromopalmitate (2-BP), puisqu'il mime l'effet de la mutation des cystéines, pouvait également délocaliser la protéine SL21 de l'appareil de Golgi vers le réseau microtubulaire. Les cellules NIH-3T3 transfectées avec le plasmide codant pour SL21 sauvage (SL^{CCC}) sont traitées au 2-bromopalmitate. Puis une triple immunofluorescence est réalisée (Figure 39).

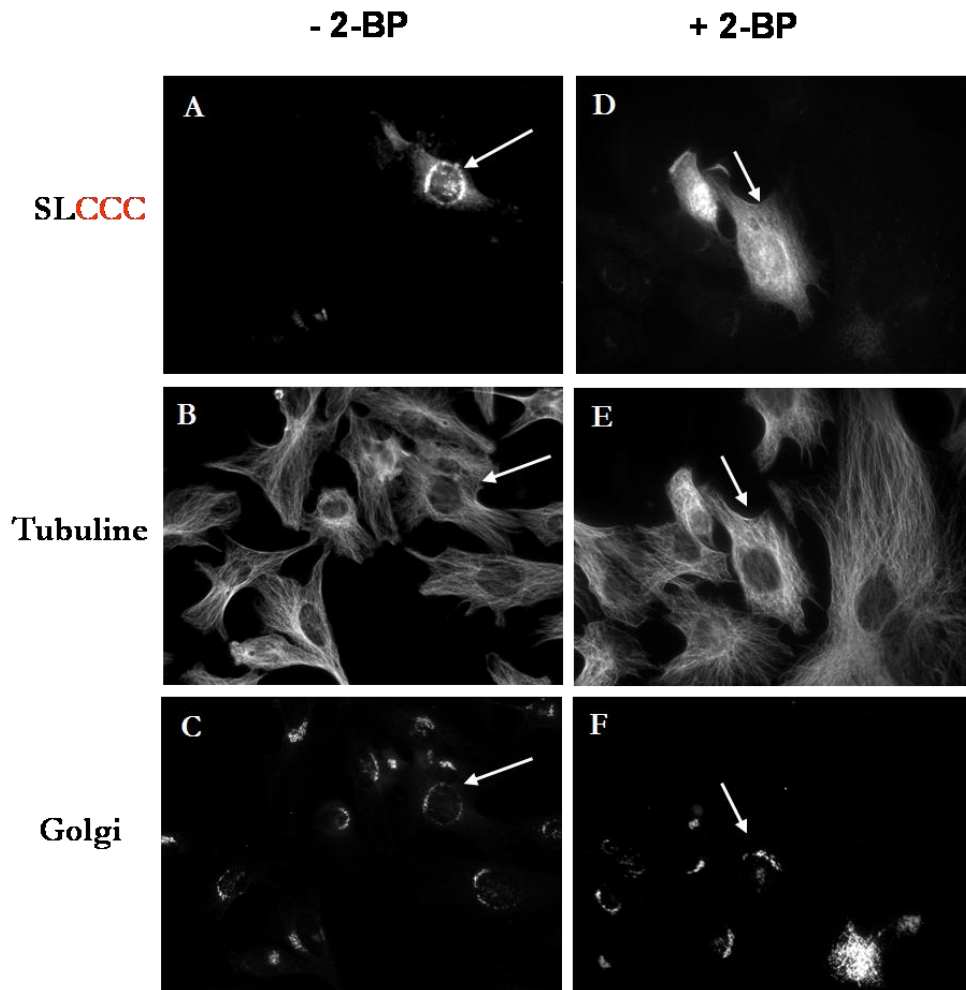


Figure 39 : Délocalisation de SL21 par traitement au 2-bromopalmitate. Les cellules NIH-3T3 sont transfectées avec le plasmide codant pour SL21 sauvage (SL^{CCC}). Les cellules sont ensuite soit traitées au 2-BP (**D**, **E**, **F**) soit non-traitées (**A**, **B**, **C**). Une triple immunofluorescence est enfin réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre SL21 (**A** et **D**), la tubuline (YL1/2 ; **B** et **E**) et l'appareil de Golgi (GM130 ; **C** et **F**).

En absence de 2-BP, SL21 sauvage (SL^{CCC}) se localise au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 39 A et C). En présence de 2-BP, SL21 ne se localise plus au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 39 D et F) mais se localise au MTs (Figure 39 D et E). La même observation est réalisée lorsque les 3 cystéines sont mutées en résidus glycine (Gory-Fauré *et al.*, 2006). L'inhibition de la palmitoylation entraîne un changement de localisation de SL21 de l'appareil de Golgi vers le

réseau microtubulaire. Sa localisation au Golgi est donc bien dépendante de la palmitoylation des résidus cystéines de son extrémité amino-terminale.

II – 1-3 Palmitoylation de la protéine N-STOP

Ces résidus cystéines palmitoylables chez SL21 sont conservés dans la protéine N-STOP. Nous avons alors voulu déterminer si la protéine N-STOP était également palmitoylable. Des cellules COS-7 sont transfectées avec un plasmide codant pour la protéine N-STOP complète ou pour un mutant délété des 12 premiers aa (ne contenant donc pas les 3 résidus cystéines, N-STOP Δ 12aa). Un « test de palmitoylation *in vitro* » est alors réalisé (Figure 40).

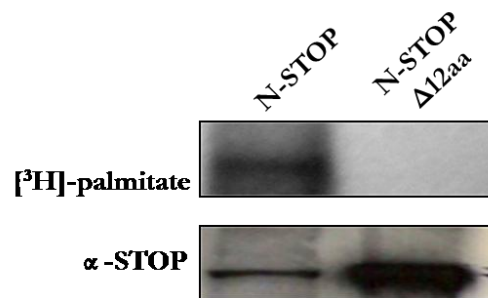


Figure 40 : Palmitoylation de la protéine N-STOP. Les cellules COS-7 sont transfectées avec un plasmide codant pour la N-STOP complète (N-STOP) ou pour un mutant délété des 12 premiers aa (N-STOP Δ 12aa), puis sont incubées en présence d'acide palmitique tritié. Les protéines sont ensuite immunoprécipitées à l'aide d'un mélange d'anticorps 23N/23C (anticorps dirigés contre la N-STOP). Les fractions immunoprécipitées sont analysées par Western-Blot à l'aide de l'anticorps 175 (α -STOP) et par autoradiographie ([³H]-palmitate).

En présence d'acide palmitique tritié, la protéine N-STOP est palmitoylable alors que son mutant N-STOP Δ 12aa ne l'est pas (Figure 40). Nous pouvons donc conclure que la protéine N-STOP est palmitoylable au niveau de ses 12 premiers aa.

II – 2 Les mutants cystéines de SL21

La palmitoylation des cystéines de SL21 est responsable de sa localisation au Golgi. Nous avons voulu poursuivre cette étude en déterminant l'importance de chaque cystéine amino-terminale dans la palmitoylation et dans la localisation au Golgi de SL21. Nous avons alors construit des plasmides codant pour des mutants ne conservant qu'une seule des trois cystéines. Chaque résidu cystéine est muté en résidu glycine. Ces constructions sont toutes fusionnées à la protéine Myc (Figure 41).

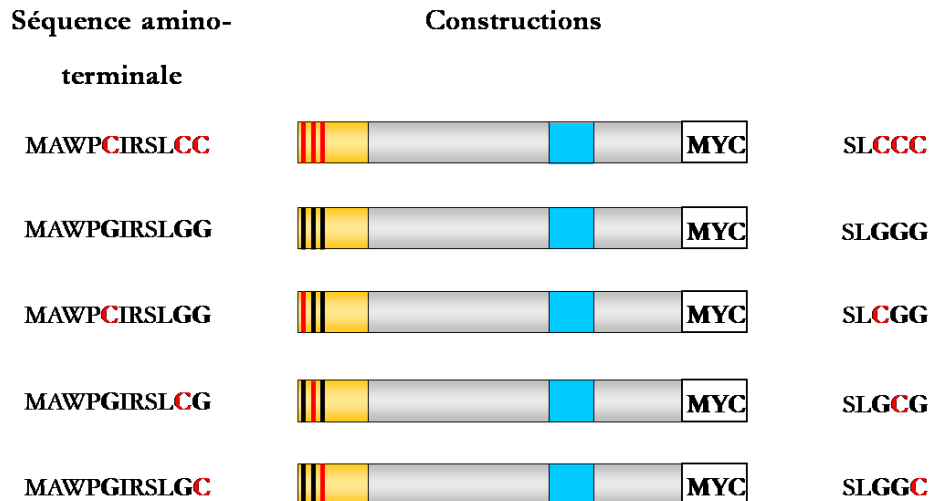


Figure 41 : Représentation schématique des mutants cystéines construits et utilisés dans cette étude. SL21^{CCC} : SL21 sauvage; SL^{GGG} : SL21 possédant les résidus cystéines (C) 5, 10 et 11 mutés en résidus glycine (G) ; SL^{CGG} : SL21 possédant les cystéines 10 et 11 mutées en glycine ; SL^{GCG} : SL21 possédant les cystéines 5 et 11 mutées en glycine ; SL^{GGC} : SL21 possédant les cystéines 5 et 10 mutées en glycine. Toutes ces constructions sont fusionnées à la protéine Myc.

 : domaine amino-terminal  module Mn3

II – 2-1 Palmitoylation des mutants cystéines de SL21

La palmitoylation de chacune des cystéines a été étudiée en réalisant un « test de palmitoylation *in vitro* ».

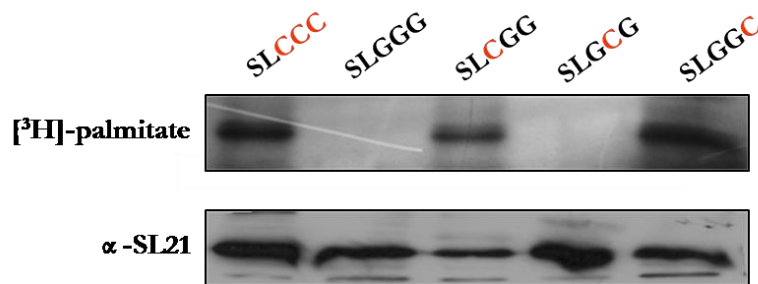


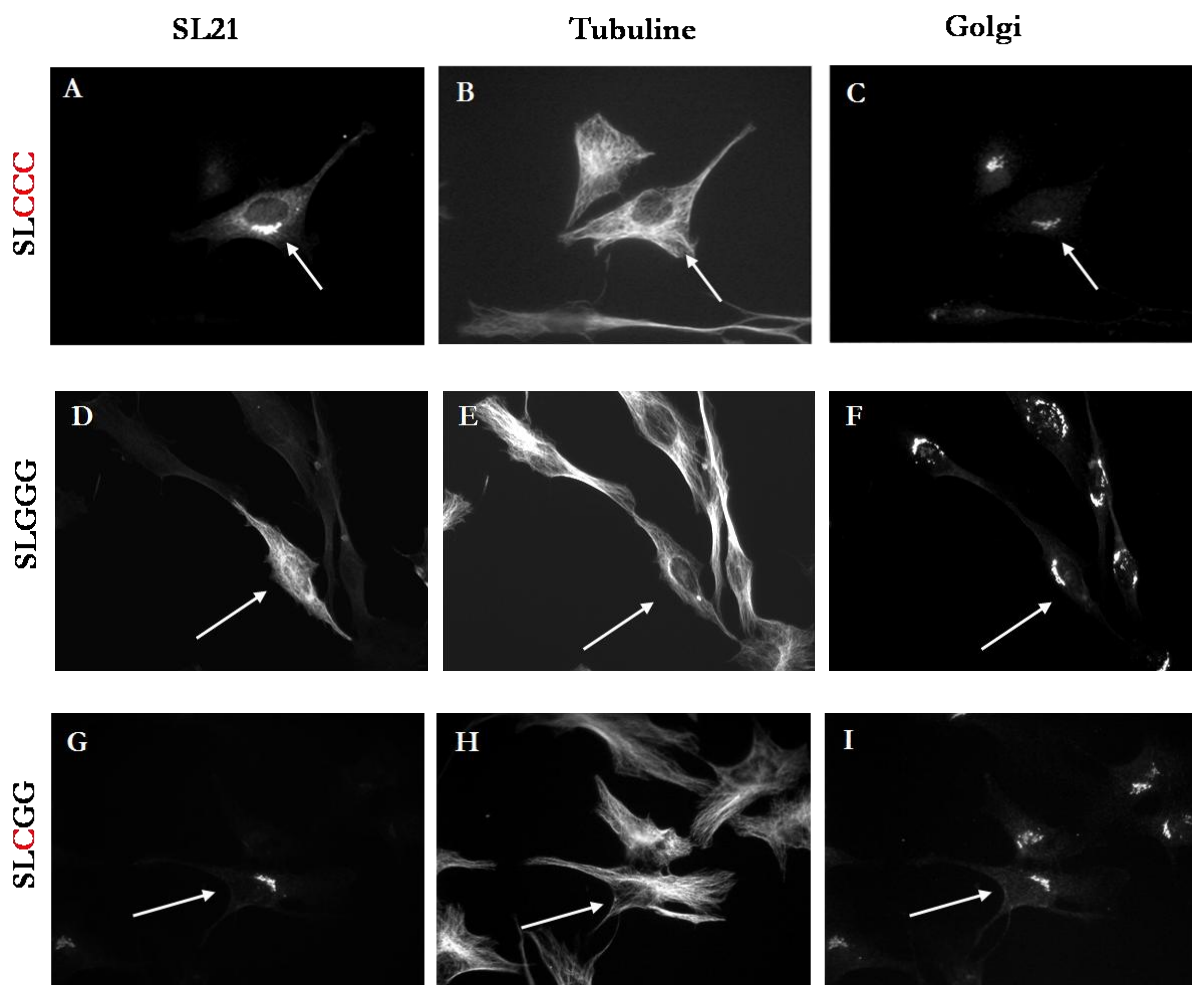
Figure 42 : Palmitoylation de SL21 et de ses mutants cystéines. Les cellules COS-7, transfectées avec les constructions décrites à la Figure 41, sont incubées en présence d'acide palmitique tritié puis sont lysées. SL21 et ses différents mutants étiquetés Myc sont immunoprécipités à l'aide d'un anticorps anti-Myc. Les fractions immunoprécipitées sont analysées par Western-Blot à l'aide de l'anticorps 3315 dirigé spécifiquement contre SL21 (α -SL21) et par autoradiographie ($[^3\text{H}]$ -palmitate).

Comme nous l'avons vu précédemment, la mutation des trois cystéines en glycine (SL^{GGG}) abolit la palmitoylation de SL21 (SL21^{CCC}) (Gory-Fauré *et al.*, 2006, Figure 42). Les mutants conservant la cystéine 5 (SL^{CGG}) ou la cystéine 11 (SL^{GGC}) peuvent être palmitoylés alors que celui où la cystéine 10 est conservée (SL^{GCG}) ne l'est pas (Figure 42).

SL21 est donc palmitoylable sur deux des trois résidus cystéines présentes à son extrémité amino-terminale : les cystéines 5 et 11.

II – 2 -2 Localisation cellulaire des mutants cystéines de SL21

Nous venons de montrer que la protéine SL21 est palmitoylée au niveau de ses cystéines 5 et 11 (Figure 42). Cette modification est importante pour cibler SL21 au niveau de l'appareil de Golgi. Pour analyser le rôle de chaque cystéine dans cette localisation, des cellules NIH-3T3 ont été transfectées par les plasmides codant pour SL21 sauvage (SLCCC) et ses différents mutants cystéines (SLGGG, SL^CGG, SL^GCG, SL^GGC ; Figure 43). Après 6 heures de transfection, les cellules sont ensuite fixées et une triple immunofluorescence est réalisée à l'aide des anticorps dirigés contre la protéine SL21, contre la tubuline et enfin contre une protéine de l'appareil de Golgi (Figure 43). Nous avons ensuite analysé la localisation sub-cellulaire (MT ou Golgi) de SL21 dans 100 cellules pour chaque construction. Cette analyse est réalisée après des temps courts de transfections (6h) pour observer majoritairement la forme sauvage de SL21 qu'au niveau de l'appareil de Golgi. Sa localisation supplémentaire aux MTs est observée à des temps de transfection plus long. Nous avons répété trois fois chaque expérience (Figure 40).



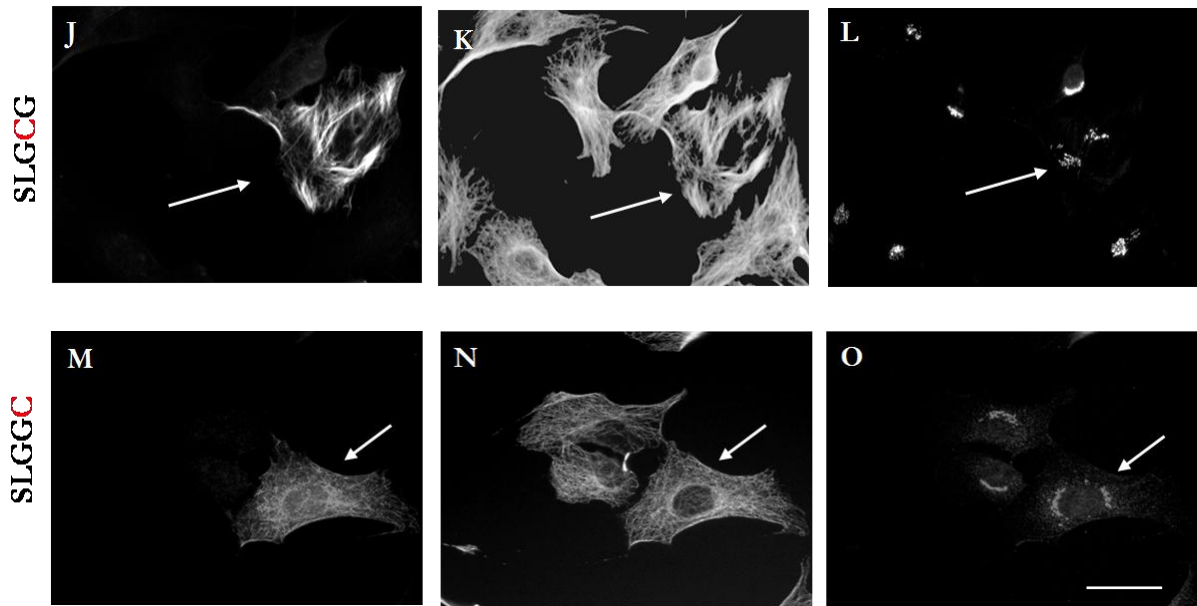


Figure 43 : Distribution intra-cellulaire de SL21 et de ses différents mutants cystéines, 6 heures après transfection. Les cellules NIH-3T3 sont transfectées avec les plasmides codant pour SL21 sauvage (SL**CCC**) ou pour les différents mutants cystéine (SLGGG, SL**CGG**, SL**GCG** et SLGGC). Les cellules sont ensuite fixées et marquées à l'aide d'anticorps anti SL21 (3315 ; **A, D, G, J, M**), anti-tubuline (YL-1/2 ; **B, E, H, K, N**) et anti-protéine du Golgi (GM130 ; **C, F, I, L, O**). Echelle : 20 μ m

SL21 sauvage (SL**CCC**) se localise majoritairement au niveau de l'appareil de golgi (Figure 43 A et C ; Figure 44) alors que son triple mutant cystéine (SLGGG) est observé principalement au niveau des MTs (Figure 43 D et E ; Figure 44). Les mutants de SL21 où seule la cystéine 10 (SL**GCG**) ou la cystéine 11 (SLGG**C**) est conservée se situent principalement au niveau des MTs (Figure 43 J et K, L et M ; Figure 44). Le mutant qui conserve sa cystéine 5 (SL**CGG**) a une répartition cellulaire comparable à celle de SL21 sauvage, à savoir une localisation majeure au niveau du Golgi (Figure 43D et E ; Figure 44).

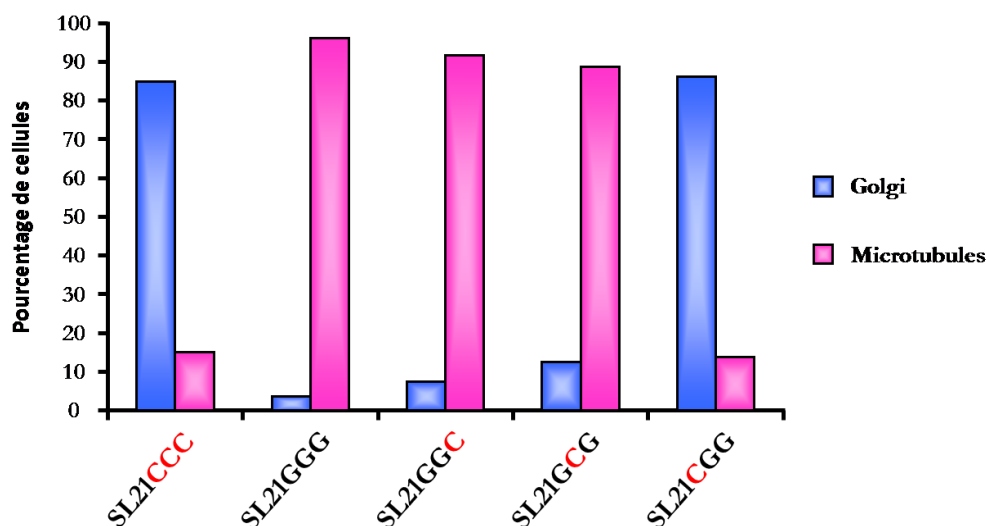
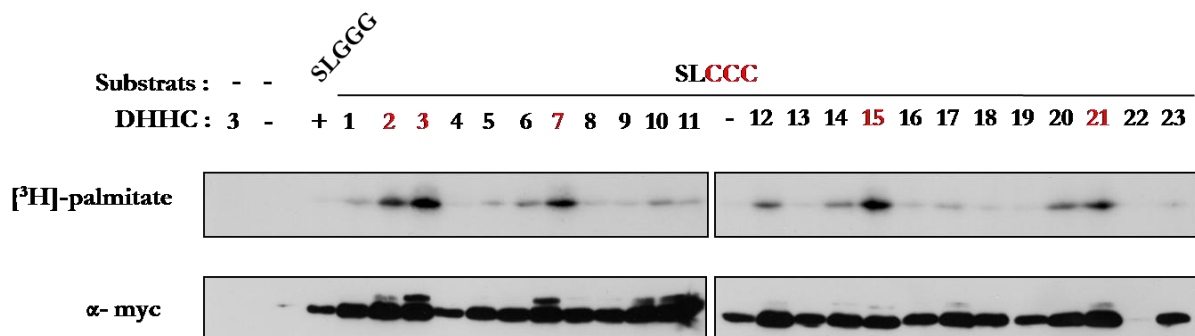


Figure 44 : Localisation au Golgi versus microtubules de SL21 après 6 heures de transfection : implication des cystéines et de la palmitoylation. Des cellules NIH-3T3 sont transfectées avec des plasmides codant pour SL21 sauvage (SL21^{CCC}), SL21 mutée sur ces trois cystéines (SL21^{GGG}) ou ne conservant qu'une seule des trois cystéines (SL21^{CGG}, SL21^{GCG}, SL21^{GGC}). Après 6 heures de transfection, les cellules sont fixées. La localisation de SL21 est observée après triple marquage des cellules à l'aide d'anticorps anti-SL21, anti-tubuline (YL1/2) et anti protéine du Golgi (GM130). 100 cellules sont observées pour déterminer la localisation de SL21 ou de ses mutants. Le graphique regroupe les résultats d'une expérience qui est représentative des trois expériences réalisées.

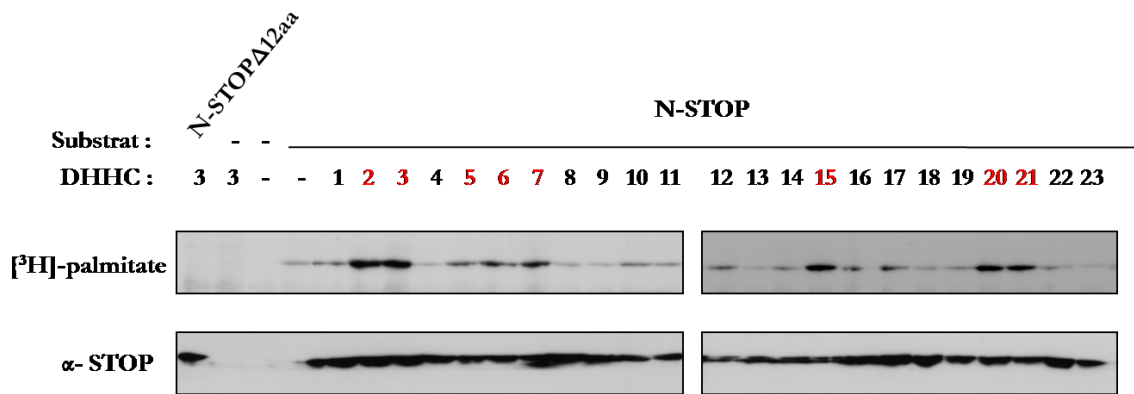
Bien que SL21 puisse être palmitoylée au niveau de ses cystéines 5 et 11, seule la cystéine 5 est nécessaire pour localiser SL21 au niveau de l'appareil de Golgi.

II – 3 Palmitoylation de SL21 endogène

Pour terminer cette étude sur la palmitoylation de SL21, nous avons souhaité confirmer que SL21 endogène pouvait être palmitoylée. SL21 est spécifiquement exprimée au niveau du cerveau (Gory-Fauré *et al.*, 2006). Au début de l'étude, nous avons fait produire un anticorps polyclonal dirigé contre un peptide de SL21 (3315) qui malheureusement n'immunoprécipitait pas SL21. Par la suite, des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre SL21 ont été produits. Nous avons obtenu plusieurs clones dont un, nommé SLF10, particulièrement intéressant puisqu'il semblait très spécifique en Western-Blot et qu'il était capable d'immunoprécipiter SL21. Un « test de palmitoylation *in vitro* » pouvait alors être réalisé sur des cultures primaires de neurones hippocampiques après 15 jours de différenciation *in vitro* pour confirmer la palmitoylation de SL21 (Figure 45).



B



C

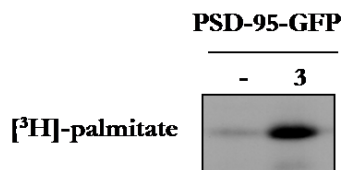


Figure 46 : Criblage des enzymes de palmitoylation de SL21 et de N-STOP. Chaque plasmide codant pour chacune des PATs (DHHC) est co-transfecté avec le plasmide codant pour SL21 sauvage fusionnée à la protéine Myc (SLCCC) (**A**) ou pour N-STOP (**B**) dans les cellules COS-7. Après une incubation en présence de palmitate tritié, les protéines sont séparées par SDS-PAGE, suivi d'une fluorographie (³H]-palmitate) et d'un Western-Blot à l'aide de l'anticorps α-myc pour révéler SL21 (**A**) ou de l'anticorps 23N pour la N-STOP (**B**). Les DHHCs présentant une activité PAT forte pour SL21 et pour N-STOP sont indiquées en rouge. (**C**) La palmitoylation « *in vitro* » de la protéine PSD-95-GFP en présence de la DHHC3 est un contrôle positif du criblage des PATs de SL21 et N-STOP.

Plusieurs protéines à domaine DHHC sont capables d'augmenter l'incorporation d'acide palmitique tritié dans la protéine SL21 (Figure 46A) ou dans la protéine N-STOP (Figure 46B) : l'augmentation est maximale lorsque les protéines DHHC 2, 3, 7, 15, 21 sont co-exprimées avec SL21 et quand les protéines DHHC 2, 3, 5, 6, 7, 15, 20 et 21 sont co-exprimées avec la protéine N-STOP. La mutation des trois cystéines de SL21 (SLGGG) ou la délétion des 12 premiers aa de la protéine N-STOP (N-STOPΔ12aa) élimine l'augmentation de l'incorporation d'acide palmitique observée lors de la co-transfection de SL21 sauvage (SLCCC) avec la protéine DHHC3 (Figure 46A et B). Ce résultat est un contrôle négatif permettant de montrer la spécificité du marquage visualisé en fluorographie. Comme contrôle positif du test de palmitoylation de SL21 et de N-STOP par les DHHCs, la protéine PSD-95 et une protéine à domaine DHHC déjà décrite comme capable de palmitoyler PSD95 (DHHC3) ont été utilisées (Fukata *et al.*, 2004). L'incorporation de palmitate sur PSD-95 est bien augmentée en présence de la protéine DHHC 3 (Figure 46C).

Nous pouvons ensuite comparer les protéines DHHCs impliquées dans la palmitoylation de SL21 et de STOP (Figure 47).

| DHHCs | 2 | 3 | 5 | 6 | 7 | 15 | 20 | 21 |
|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| SL21 | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | + | ++ |
| STOP | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

Figure 47 : Récapitulatif des protéines DHHC (PATs) communes à STOP et SL21. ++ activité PAT forte ; + activité PAT faible. Les protéines possédant une activité semblable sur STOP et sur SL21 sont indiquées en rouge.

Nous observons que les DHHCs 2, 3, 7, 15 et 21 possèdent une activité PAT identique sur SL21 et sur STOP. Les DHHCs 2, 3, 7 et 15 sont regroupées sur la même branche de l'arbre phylogénique des DHHCs et sont déjà décrites comme les enzymes responsables de la palmitoylation de la protéine PSD-95 (Fukata *et al.*, 2004). Ces observations pourraient mettre en évidence une spécificité des protéines DHHC 2, 3, 7 et 15 pour des substrats ayant leurs sites de palmitoylation en amino-terminal des protéines.

Ces résultats complémentaires font l'objet d'une publication en cours de rédaction.

III – Conclusion et perspectives

Dans cette première partie de mon travail, nous avons montré que SL21 et N-STOP se localisent au niveau de l'appareil de Golgi à faible taux d'expression puis au niveau des MTs lorsqu'elles sont fortement exprimées dans des cellules non-neuronales. La localisation au Golgi de SL21 endogène est retrouvée dans des neurones hippocampiques jeunes en culture (DIV 9). Dans des neurones en culture plus âgés (> DIV 15), SL21 présente une localisation supplémentaire au niveau de vésicules le long des extensions neuritiques. Il serait intéressant d'identifier précisément la nature des vésicules neuritiques SL21-positives, en réalisant par exemple des marquages de protéines spécifiques des compartiments membranaires neuritiques [γ -adaptatine comme marqueur du trans Golgi, β COP pour marquer les vésicules bourgeonnant du trans-Golgi, Rab4 pour marquer les endosomes, etc (Horton and Ehlers, 2003)]. Ces différents marqueurs sont très concentrés au niveau du soma mais sont également présents de façon ponctuelle le long des dendrites (Sytnyk *et al.*, 2001). Une distribution similaire entre SL21 et l'un de ces marqueurs permettrait d'explicitier la nature des vésicules marquées par SL21.

Nous avons également cherché à identifier les déterminants moléculaires du ciblage des protéines SL21 et N-STOP au niveau de l'appareil de Golgi. La région amino-terminale de ces deux protéines présente de fortes homologues de séquence, en particulier 3 cystéines en position 5, 10 et 11, dans un contexte d'acides aminés basiques, favorable à la palmitoylation. Cette

modification post-traductionnelle permet d'ajouter un acide gras de type palmitate sur les cystéines, ce qui conduit à un ancrage des protéines dans les membranes. J'ai mis au point les conditions expérimentales permettant de mesurer la palmitoylation, pour les protéines endogènes SL21 et STOPS dans des neurones en culture ou en surexpression dans des cellules non-neuronales. Dans tous les cas, nous avons montré que SL21 et N-STOP sont palmitoylées et que cette modification est indispensable à leur ciblage à l'appareil de Golgi. De plus, l'utilisation de mutants de délétion ponctuelle pour chacune des cystéines potentiellement impliquée, a montré que seules les cystéines 5 et 11 sont effectivement palmitoylées et que la palmitoylation de la cystéine 5 est nécessaire et suffisante pour le ciblage au Golgi de SL21. La cystéine 11 pourrait alors jouer un rôle complémentaire pour le ciblage de cette protéine dans un autre compartiment sub-cellulaire membranaire. Afin de répondre à cette interrogation, il sera nécessaire d'utiliser un mutant de SL21 couplant mutation ponctuelle des cystéines et délétion du module Mn3 (module de liaison aux MTs). La présence du domaine Mn3 semble suffisante pour cibler aux MTs SL21 (voir Discussion).

Chapitre 2 : Les partenaires de SL21

Les résultats traités dans le premier chapitre nous montre que les protéines N-STOP et SL21 partagent de nombreuses fonctions : capacité de lier et de stabiliser les MTs, liaison à la calmoduline et association au Golgi via la palmitoylation de leur domaine amino-terminal. Nous avons alors émis l'hypothèse que ces deux protéines pourraient posséder des partenaires communs.

Un criblage en double hybride, réalisé chez la levure, a été utilisé pour détecter les interactions de la protéine N-STOP avec ses partenaires potentiels *in vivo*. Différentes protéines cibles ont alors été mises en évidence : la protéine Arc (Activity-Regulated cytoskeletal-associated protein), la protéine Kip (DNA-PKcs interacting protein), la protéine Nsg2 (Neuron Specific gene 2) et la protéine Tctex1 (T-complex testis expressed 1). Un test double-hybride ciblé a ensuite été réalisé, au laboratoire, pour regarder si ces protéines sont également des partenaires de SL21 et si les protéines SL21 et les STOPS neuronales pouvaient interagir entre elles (A. Martinez et E. Denarier ont entrepris ce double-hybride ciblé). Cette étude a permis de mettre en évidence, l'interaction de SL21 avec la protéine Tctex1 et la protéine E-STOP. Une interaction de SL21 avec elle-même a également été observée.

La protéine Tctex1 est une protéine homodimérique de 14 kDa, font partie des chaînes légères du moteur moléculaire dynéine qui est impliqué dans le transport rétrograde d'organelles et de vésicules le long des MTs (Mok *et al.*, 2001 ; Di Bella *et al.*, 2001 ; Vallee *et al.*, 2004). Dans les neurones, Tctex1 est une protéine enrichie au niveau des extrémités distales et notamment dans les cônes de croissances au cours de la différenciation neuronale (Chuang *et al.*, 2005).

La protéine Tctex1 se présente sous deux formes :

- soit elle est associée au moteur moléculaire dynéine. Elle participe alors aux fonctions de la dynéine, en servant d'adaptateur entre le moteur et le cargo (Figure 48).
- soit elle est libre, non associée au moteur moléculaire (Chuang *et al.*, 2005). Elle serait alors impliquée dans la régulation de la croissance neuronale par l'intermédiaire de sa liaison aux sous-unités $\alpha\beta$ des protéines G (Sachdev *et al.*, 2007). Elle interagit également avec les canaux calciques VGCCs (Lai *et al.*, 2005). Cette interaction joue un rôle sur le ciblage de ces canaux à la surface cellulaire des neurones hippocampiques. Enfin, Tctex-1 est reliée au pool vésiculaire pré-synaptique (Chuang *et al.*, 2001).

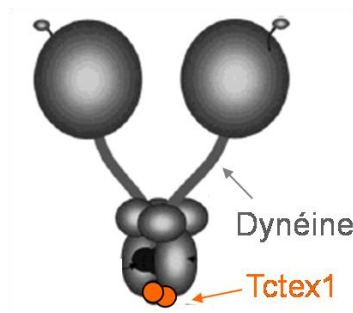


Figure 48 : Représentation schématique de la dynéine. La protéine Tctex1 est une de ses chaînes légères.

Ces résultats de double-hybride doivent être confirmés dans un autre système que la levure. Nous avons choisi de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) à partir de lysat de cellules COS-7 transfectées et à partir de lysats de cerveau de souris.

I – Interaction de SL21 et de Tctex1

I – 1 Validation de l'interaction par co-immunoprécipitation

Pour valider Tctex1 en tant que partenaire de SL21, nous avons co-transfecté les plasmides codant pour la protéine SL21 fusionnée à la GFP et pour la protéine Tctex1 fusionnée à la protéine Myc dans les cellules COS-7. Les cellules sont ensuite lysées et le surnageant ou lysat brut (LB) est incubé soit avec des billes couplées à un anticorps dirigé contre la protéine Myc (Figure 49 ; IP : Anti-Myc) soit avec des billes couplées à un anticorps dirigé contre la protéine GFP (Figure 49 ; IP : Anti-GFP) ou enfin avec des billes seules (Figure 49 ; IP : Pas d'anticorps).

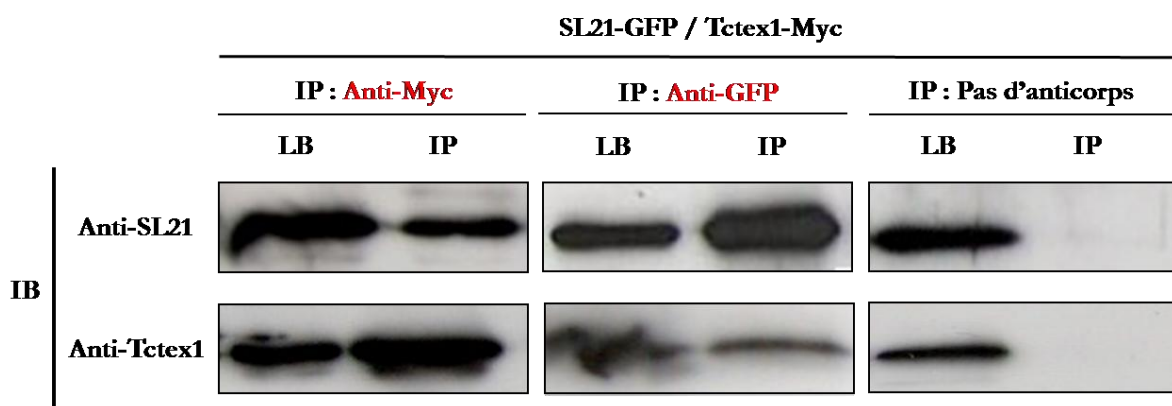


Figure 49 : Co-immunoprécipitation de SL21 et de Tctex1. Des cellules COS-7 sont co-transfectées

avec SL21-GFP et Tctex1-Myc (SL21-GFP/Tctex1-Myc). Ensuite, soit la protéine Tctex1-Myc est immunoprécipitée par un anticorps dirigé contre la protéine Myc (IP : anti-Myc), soit la protéine SL21-GFP est immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la GFP (IP : anti-GFP). Un contrôle est réalisé sans anticorps (IP : pas d'anticorps). Le lysat brut (LB) et les fractions immunoprécipitées (IP) sont ensuite analysés par western-blot (IB) à l'aide d'anticorps dirigé contre SL21 (anti-SL21 ; 3315) et dirigé contre Tctex1 (anti-Tctex1 ; 2026).

Les protéines SL21-GFP et Tctex1-Myc sont bien co-exprimées dans les cellules COS-7 (Figure 49 ; piste LB). Tctex-Myc est bien immunoprécipité par l'anticorps anti-Myc. SL21-GFP est retrouvée dans la fraction immunoprécipitée de Tctex1-Myc (Figure 49 ; IP : anti-Myc). Si nous observons la co-immunoprécipitation inverse : Tctex-Myc est mis en évidence dans la fraction immunoprécipitée de SL21-GFP (Figure 49 ; IP : Anti-GFP). Aucun signal n'est détecté lorsque la co-immunoprécipitation est réalisée avec les billes seules (Figure 49 ; IP : pas d'anticorps). Nous pouvons donc conclure que Tctex1 co-immunoprécipite avec SL21 et inversement. Ces résultats confirment ceux obtenus en double hybride.

I – 2 Détermination du site d'interaction de Tctex1 sur SL21

Afin d'approfondir l'étude de cette interaction, nous avons voulu localiser la zone d'interaction entre SL21 et Tctex1. Nous avons choisi tout d'abord de tester l'interaction de Tctex1 avec des constructions qui permettent de scinder SL21 en deux parties : le plasmide SL21 (121-191)-GFP et SL21 (1-121)-GFP (Figure 50).

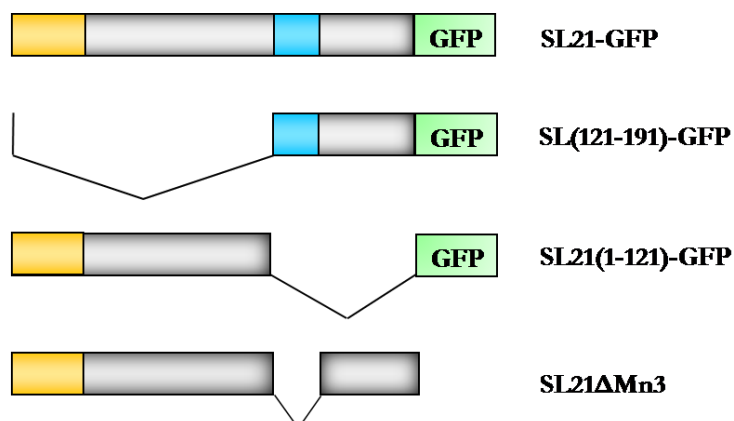


Figure 50 : Représentation schématique des différents mutants de délétion utilisés. Différents plasmides codant pour des formes tronquées de SL21 ont été utilisés : un plasmide codant pour la région comprise entre les aa 121 et 191 fusionnée à la GFP (SL (121-191)-GFP), un autre codant pour la région comprise entre les aa 1 et 121 fusionnée à la GFP (SL(1-121)-GFP) et un dernier codant pour SL21

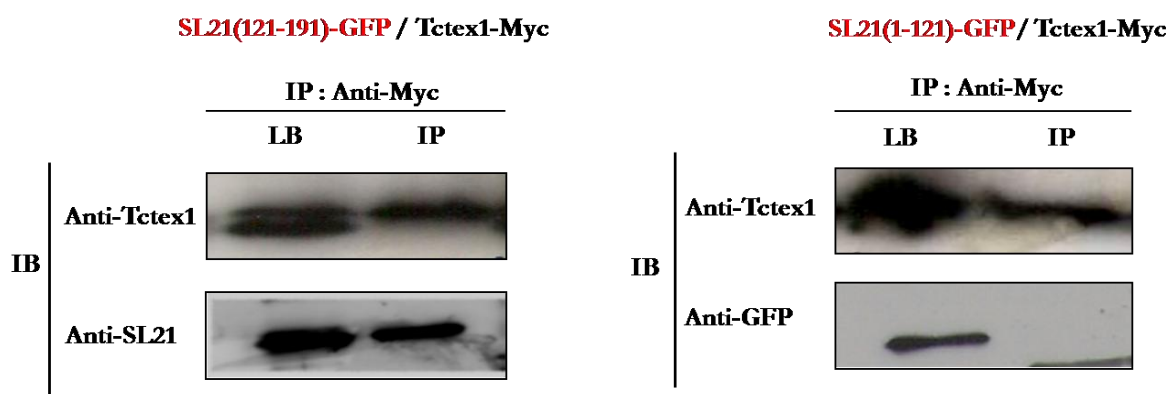
délétée pour son domaine Mn3 (SLΔMn3).

■ : domaine amino-terminal ■ module Mn3

Les plasmides codant pour les deux formes tronquées de SL21 (SL21 (121-191)-GFP et SL21 (1-121)-GFP) ainsi que celui codant pour la protéine Tctex1 fusionnée à la protéine Myc sont co-transfectés dans les cellules COS-7. Une immunoprécipitation est ensuite réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine Myc (Figure49). Les lysats bruts (LB) et les différentes fractions immunoprécipitées sont analysés par Western-Blot en utilisant soit l'anticorps 3315 spécifique de SL21 soit un anticorps dirigé contre l'étiquette GFP (le 3315 ne pouvant reconnaître le mutant SL21 (1-121) GFP) pour révéler SL21 et un anticorps anti-Tctex1 (Figure 51 A et B).

A

B



C

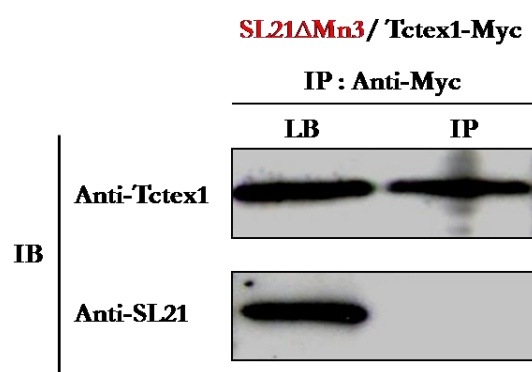


Figure 51 : Zone d'interaction de Tctex1 et SL21. Des cellules Cos sont co-transfectées avec SL21 (121-191)-GFP et Tctex1-Myc (**A**), ou avec SL21(1-121)-GFP et Tctex1-Myc (**B**), ou avec SL21ΔMn3 et Tctex1-Myc (**C**). Tctex1-Myc est ensuite immuno-précipitée à l'aide d'un anticorps dirigé contre Myc (IP : anti-Myc). Les lysats bruts (LB) et la fraction immunoprécipitée (IP) sont ensuite analysés par Western-Blot (IB) à l'aide d'un anticorps dirigé contre SL21 (anti-SL21 3315 ; **A** et **C**) ou dirigé contre la protéine GFP (Anti-GFP ; **B**) et d'un anticorps anti-Tctex1 (anti-Tctex1 2026 ; **A**, **B** et **C**).

SL21 (121-191) co-immunoprécipite avec la protéine Tctex1 (Figure 51A), alors que SL21 (1-121)-GFP n'est pas mis en évidence dans la fraction immunoprécipitée de Tctex1 (Figure 51B). En confrontant ces résultats, nous pouvons déduire que le site d'interaction de Tctex1 se situe dans la moitié carboxy-terminale de SL21.

La moitié carboxy-terminale de SL21 contient le domaine Mn3, qui est conservé entre les protéines N-STOP et SL21. Tctex1 étant également un partenaire des protéines STOPs, nous avons alors émis l'hypothèse que l'interaction entre SL21 et Tctex1 devait se situer au niveau du module Mn3. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé une immunoprécipitation de Tctex1-Myc après l'avoir co-transfecté avec SL21 délété du domaine Mn3 (SL21ΔMn3 ; Figure 50 et 51C). Nous observons que SL21ΔMn3 ne co-immunoprécipite pas avec Tctex1.

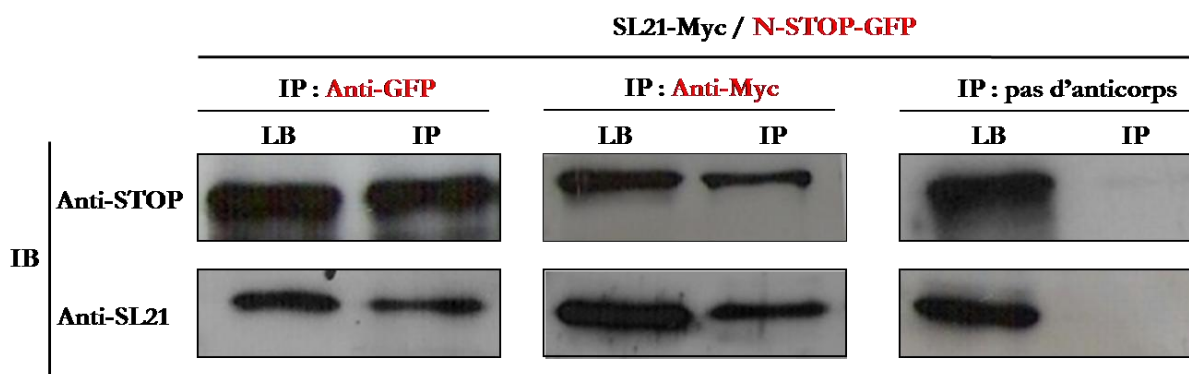
Par cette étude, nous avons montré que SL21 partage un partenaire commun, la protéine Tctex1, avec la protéine N-STOP. Cette protéine interagit au niveau du domaine Mn3 de SL21. La caractérisation de la zone d'interaction de la protéine N-STOP avec la protéine Tctex1, également étudié au laboratoire, aboutit à un résultat similaire (communication personnelle, F. Dufour).

II – Interaction de SL21 avec les STOPs

II – 1 Validation de l'interaction par co-immunoprécipitation

L'interaction de SL21 avec la protéine E-STOP a été montrée par double hybride. Nous avons alors vérifié l'interaction SL21/E-STOP par co-immunoprécipitation mais également l'interaction de SL21 et de N-STOP, la N-STOP ayant de très forte homologie avec la E-STOP (Figure 52). Des cellules sont transfectées avec SL21-Myc et N-ou E-STOP fusionnées à la GFP (N-STOP-GFP et E-STOP-GFP). Nous avons réalisé soit une immunoprécipitation des protéines N- et E-STOP-GFP à l'aide de l'anticorps anti-GFP, soit une immunoprécipitation de SL21-Myc à l'aide d'un anticorps anti Myc. Les lysats bruts et les fractions immunoprécipitées sont ensuite analysées par Western-Blot avec un anticorps spécifique des protéines STOPs (23N) et un anticorps anti-SL21 (3315) (Figure 52A et B).

A



B

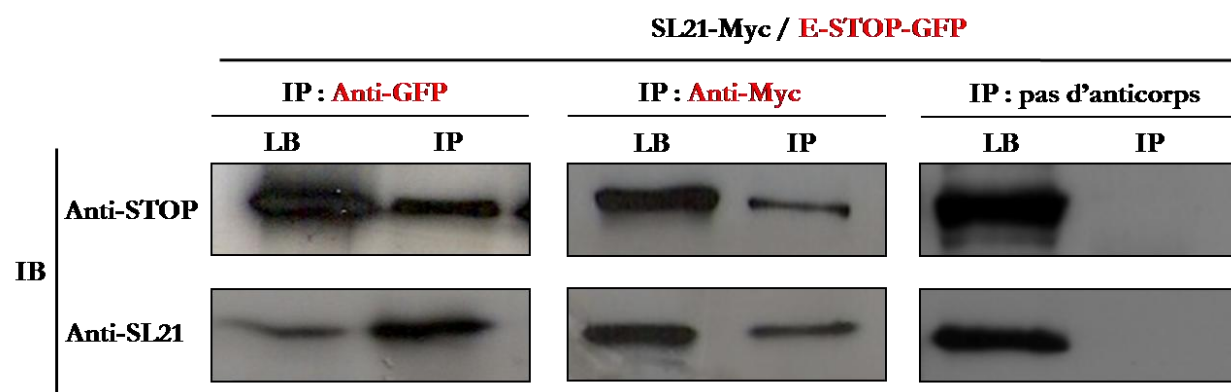


Figure 52 : Co-immunoprécipitation de SL21 avec les protéines N- et E-STOP. Des cellules COS-7 sont co-transfectées soit avec SL21-Myc et E-STOP-GFP (**A**), soit avec SL21-Myc et N-STOP-GFP (**B**).

Les protéines E- et N-STOP-GFP sont ensuite immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine GFP (IP : anti-GFP) et la protéine SL21-Myc par un anticorps anti-Myc (IP : Anti-Myc). Le lysat brut (LB) et la fraction immunoprécipitée (IP) sont ensuite analysés par Western-Blot (IB) à l'aide d'un anticorps dirigé contre SL21 (anti-SL21 3315) et d'un anticorps anti-STOP (23N).

La protéine SL21 est détectée dans les fractions immunoprécipitées de N-STOP-GFP (Figure 52A ; IP : anti-GFP) et de E-STOP-GFP (Figure 52B ; IP : anti-GFP). Inversement, la protéine N-STOP-GFP est retrouvée dans la fraction immunoprécipitée de SL21-Myc (Figure 52A ; IP : anti-Myc). La protéine E-STOP l'est également (Figure 52B ; IP : anti-Myc). Aucun signal n'est observé lorsque l'immunoprécipitation est réalisée avec les billes seules (Figure 52 A et B ; IP : pas d'anticorps).

Nous avons donc confirmé les résultats de double-hybride qui mettaient en évidence une interaction de SL21 avec la protéine E-STOP et montré que SL21 pouvait également interagir avec la protéine N-STOP.

II – 2 Interaction de SL21 et de STOP endogène

L'immunoprécipitation de SL21 endogène a pu, grâce à l'obtention d'un anticorps dirigé contre la protéine SL21 immunoprécipitant (SLF10), être entreprise à partir d'un extrait de cerveau d'une souris adulte (Figure 53). L'extrait de cerveau est incubé en présence de billes couplées ou non à l'anticorps SLF10. Nous analysons ensuite la fraction immunoprécipitée de SL21 à l'aide d'un anticorps spécifique de STOP (23N, anti-STOP) ou dirigé contre la protéine SL21 (anti-SL21).

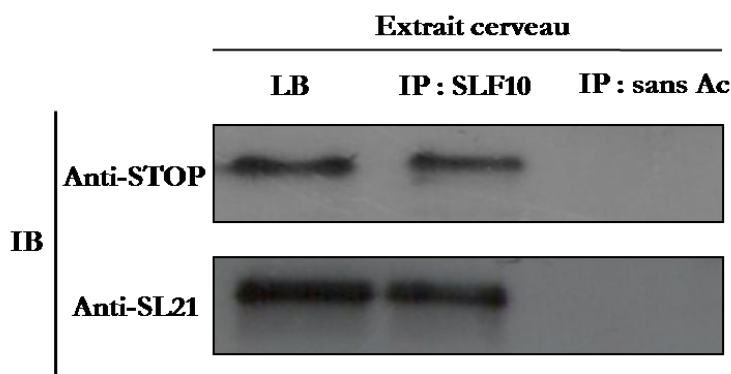


Figure 53 : Co-immunoprécipitation de SL21 et de STOP à partir d'un extrait de cerveau. Un extrait de cerveau de souris est réalisé. Le Lysat Brut (LB) est incubée avec des billes couplées ou non avec l'anticorps SLF10. Le LB et la fraction immunoprécipitée (IP) sont étudiées en Western-Blot (IB) à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine STOP (23N, anti-STOP) ou dirigé contre la protéine SL21 (anti-SL21).

Dans la fraction immunoprécipitée de SL21, nous observons la protéine N-STOP (Figure 53 ; IP : SLF10). Nous avons donc mis en évidence une interaction de SL21/STOP dans le

cerveau et confirmé les résultats obtenus après surexpression des deux protéines dans les cellules (Figure 52 et Figure 53).

III – Interaction SL21 / SL21

III – 1 Validation de l'interaction par co-immunoprécipitation

L'interaction de SL21 avec elle-même a été montrée en double hybride. Pour confirmer ce résultat, nous avons tenté de co-immunoprécipiter SL21 fusionnée à la GFP (SL21-GFP) et SL21 fusionnée à la protéine Myc (SL21-Myc). Une différence de poids moléculaire est observée entre les deux protéines : 51 kDa pour SL21-GFP et 21 kDa pour SL21-Myc. Ces deux protéines sont co-exprimées dans des cellules Cos. Nous avons ensuite réalisé l'immunoprécipitation de SL21-GFP à l'aide d'un anticorps anti-GFP et également l'immunoprécipitation de SL21-Myc à l'aide de l'anticorps anti-Myc (Figure 54). La co-immunoprécipitation est alors analysée par Western-Blot.

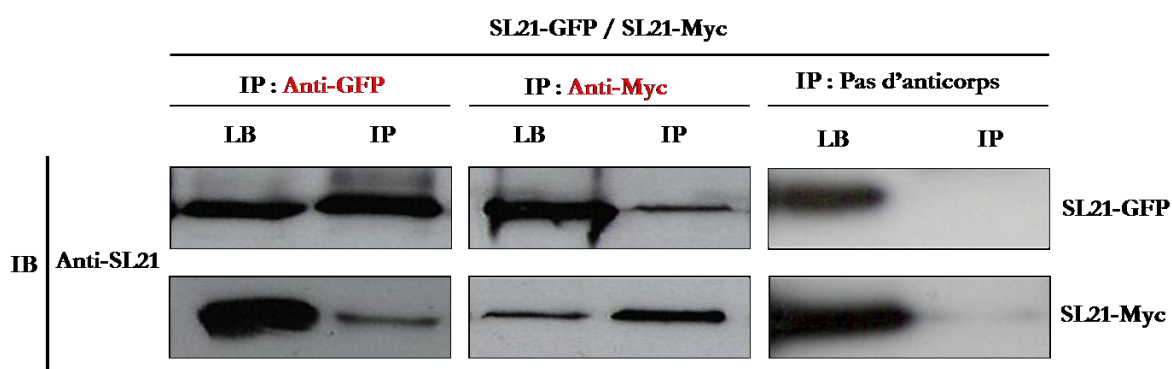


Figure 54 : Co-immunoprécipitation de SL21-GFP et de SL21-Myc. Des cellules COS-7 sont co-transfectées avec SL21-Myc et SL21-GFP. Les cellules sont ensuite lysées. Une immunoprécipitation de SL21-GFP est réalisée à l'aide d'un anticorps anti-GFP (IP : anti-GFP) et celle de SL21-Myc avec un anticorps dirigé contre la protéine Myc (IP : Anti-Myc). Un contrôle est réalisé sans anticorps (IP : pas d'anticorps). Le lysat brut et la fraction immunoprécipitée sont analysées par Western-Blot (IB) à l'aide d'un anticorps anti-SL21.

Les protéines SL21-GFP et SL21-Myc sont bien co-exprimées dans les cellules (Figure 54, piste LB). SL21-Myc est révélée dans la fraction immunoprécipitée de SL21-GFP (Figure 54 ; IP : anti-GFP) et SL21-GFP dans celle de SL21-Myc (Figure 54 ; IP : anti-Myc). Ces résultats confirment ceux obtenus en double hybride.

III – 2 Détermination du site d'interaction SL21/SL21

Nous avons poursuivi cette étude par la détermination de la zone impliquée dans l'interaction de SL21 avec elle-même. Nous avons montré que SL21 interagissait avec les STOPs et avec elle-même. Deux zones pouvaient alors être importantes pour ces interactions : le domaine amino-terminal ainsi que le module de liaison et de stabilisation aux MTs (Mn3). Des données bibliographiques mettaient en évidence l'implication de la palmitoylation dans la multimérisation de la protéine PSD-95 (Christopherson *et al.*, 2003). Nous avons alors émis l'hypothèse que l'interaction SL21/SL21 se situerait au niveau de son extrémité amino-terminale. Nous avons alors testé par co-immunoprécipitation l'interaction de SL21-GFP avec un mutant de SL21 délété du domaine amino-terminal SL21ΔN (Figure 55). Ce mutant est dépourvu du site de palmitoylation de SL21.

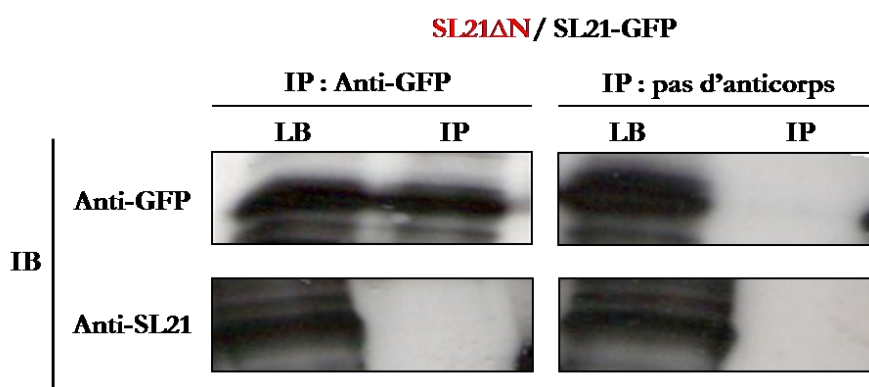


Figure 55 : Co-immunoprécipitation de SL21ΔN et de SL21-GFP. Des cellules COS-7 sont co-transfectées avec SL21-GFP et SL21ΔN (SL21-GFP/ SL21ΔN). SL21-GFP est ensuite immuno-précipité à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine GFP (IP : anti-GFP). Le lysat brut (LB) et la fraction immunoprécipitée (IP) sont ensuite analysés par western-blot (IB) à l'aide d'un anticorps dirigé contre SL21 (anti-SL21 3315).

Le mutant SL21ΔN n'est pas co-immunoprécipité avec SL21-GFP (Figure 55, IP : anti GFP). Le site d'interaction de SL21 avec elle-même est donc localisé au niveau de son domaine amino-terminal.

III – 3 Implication de la palmitoylation dans l'interaction de SL21 avec elle-même

III – 3-1 Co-immunoprécipitation en présence de 2-bromopalmitate

Nous venons de montrer le rôle de l'extrémité amino-terminale dans la multimérisation de SL21. Nous avons ensuite réalisé la co-immunoprécipitation de SL21-Myc et de SL21-GFP en présence d'un inhibiteur de la palmitoylation : le 2-bromopalmitate (2-BP) pour étudier l'implication possible de la palmitoylation dans l'interaction de SL21 avec elle-même (Figure 56).

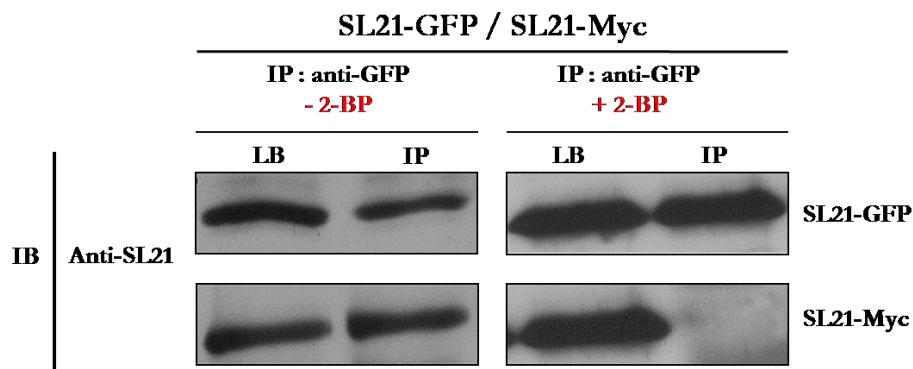


Figure 56 : Co-immunoprécipitation de SL21-GFP et de SL21-Myc en présence de 2-bromopalmitate. Les cellules transfectées avec SL21-GFP et SL21-Myc sont incubées en absence (-2-BP) ou en présence de 2-bromopalmitate (+2-BP). Une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-GFP est ensuite réalisée. Les lysats bruts (LB) et les fractions où SL21-GFP est isolée (IP) sont analysés par Western-Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre SL21(3315).

En absence de 2-bromopalmitate, SL21-Myc est retrouvée dans la fraction immunoprécipitée de SL21-GFP (Figure 56 ; IP : anti-GFP ; -2-BP) alors qu'elle ne l'est pas en présence de 2-BP (Figure 56 ; IP : anti-GFP ; +2-BP). L'inhibition de la palmitoylation de SL21 inhibe donc sa co-immunoprécipitation.

III – 3-2 Spécificité de la co-immunoprécipitation

La palmitoylation semble importante dans cette interaction. Afin de vérifier que ces co-immunoprécipitations ne sont pas des artefacts causés par la surexpression de protéines palmitoylées, nous avons choisi d'analyser l'interaction de SL21 avec le domaine A des protéines appartenant à la famille de la stathmine. Ce domaine A est responsable de leur localisation au Golgi via la palmitoylation de ses cystéines. (Di Paolo *et al.*, 1997). Nous avons alors transfecté des cellules COS-7 avec les plasmides codant pour le domaine A fusionné à la GFP (dom A-GFP) et pour SL21-Myc. Nous avons alors réalisé l'immunoprécipitation de SL21-Myc ou du domaine A-GFP (Figure 57).

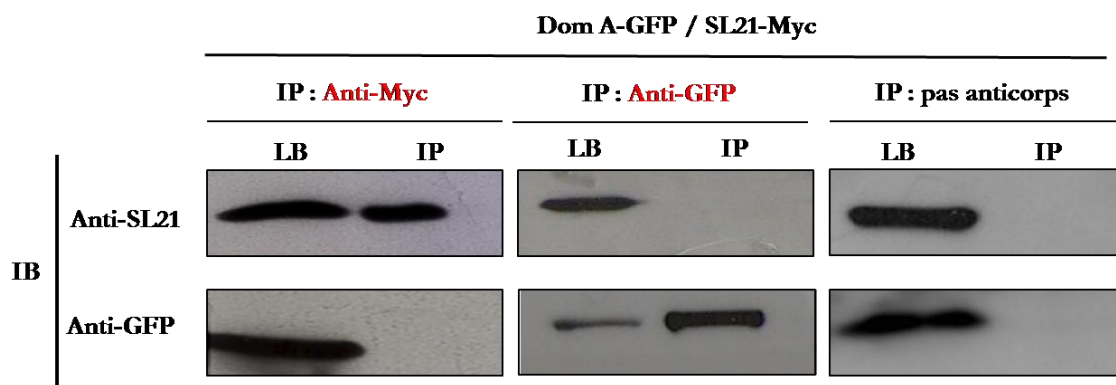


Figure 57 : Co-immunoprécipitation de SL21-Myc et du domaine A des protéines de la famille de la stathmine (dom A-GFP). Après co-transfection des cellules Cos avec les plasmides codant pour le domaine A de la protéine SCG10 fusionnée à la GFP (DomA-GFP) et pour SL21-Myc, les cellules sont ensuite lysées. Le lysat brut (LB) est incubée avec des billes couplées à un anticorps anti-Myc (IP : Anti-Myc) ou à un anticorps anti-GFP (IP : anti-GFP) ou non (IP : Sans anticorps). Le LB et la fraction immunoprécipitée (IP) sont ensuite analysées par Western-Blot (IB) à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine SL21 (Anti-SL21) ou contre la GFP (Anti-GFP)

Le domaine A des protéines relatives à la stathmine n'est pas retrouvé dans la fraction immunoprécipitée de SL21-Myc (Figure 57 ; IP : anti-Myc). SL21-Myc n'est également pas co-immunoprécipité avec le domaine A (Figure 57 ; IP : anti-GFP).

Nous pouvons donc conclure que l'interaction de SL21 avec elle-même dépendant de la palmitoylation est spécifique.

III – 3- 3 Co-immunoprécipitation de SL21 et de ses mutants cystéines.

Comme nous l'avons déjà vu, deux cystéines peuvent être palmitoylées dans SL21. Nous avons donc regardé l'interaction de SL21 avec les différents mutants cystéines. Le triple mutant cystéine SLGGG ainsi que les mutants ne conservant qu'une seule cystéine fusionnés à la protéine Myc (SLCGG, SLGCG, SLGGC) sont co-transfectés dans les cellules avec SL21 sauvage fusionnée à la GFP. Différentes immunoprécipitations sont ensuite réalisées (Figure 58).

A

B

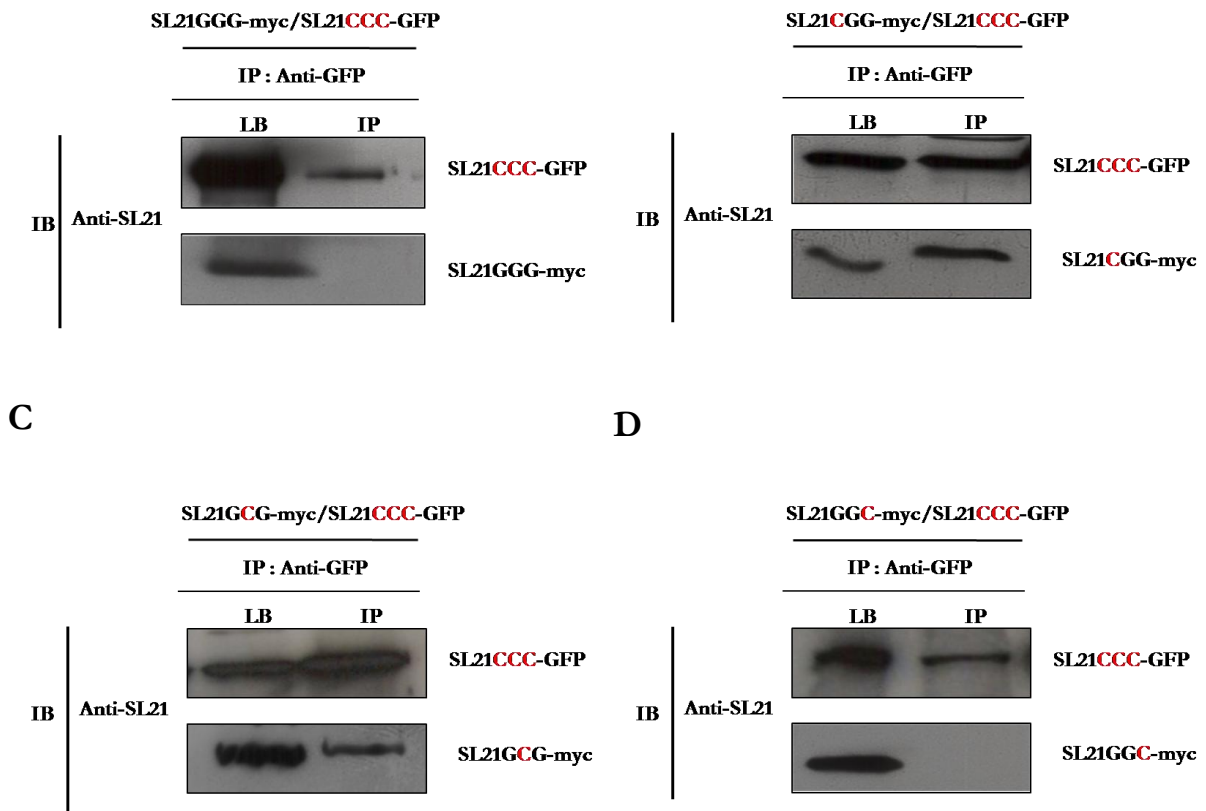


Figure 58 : Co-immunoprécipitation de SL21-GFP et des mutants cystéines de SL21-Myc. Des cellules COS-7 sont co-transfectées avec SL21**CCC**-GFP et SL21**GGG**-Myc (**A**) ou SL**CGG**-Myc (**B**), ou SL**GCG**-Myc (**C**) ou SL**GGC**-Myc (**D**). SLCCC-GFP est ensuite immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine GFP (IP : anti-GFP ; **A**, **B**, **C** et **D**). Le lysat brut (LB) et la fraction immunoprécipitée (IP) sont ensuite analysés par Western-Blot (IB) à l'aide d'un anticorps dirigé contre SL21 (anti-SL21 3315).

Nous observons, dans la fraction immunoprécipitée de SL21-GFP, que :

- le triple mutant cystéine de SL21 (SL21**GGG**) n'est pas co-immunoprécipité (Figure 58A). Ce résultat est cohérent avec l'absence d'interaction de SL21 avec elle-même observée lors de la co-immunoprécipitation réalisée en présence de 2-bromopalmitate (Figure 56), le triple mutant n'étant pas palmitoylable.
- le mutant de SL21 où seule la cystéine 5 (SL**CGG**) est conservée est retrouvé (Figure 58B)
- le mutant de SL21 où seule la cystéine 10 est conservée (SL**GCG**) est également présent (Figure 58 C)

- le mutant conservant uniquement la cystéine 11 n'est pas retrouvée (Figure 58 D).

La cystéine 5 et la cystéine 10 jouent donc un rôle important dans l'interaction de SL21 avec elle-même. Ces résultats nous ont surpris. En effet, nous pensions que, comme pour PSD-95, les deux cystéines palmitoylables joueraient un rôle dans cette interaction. Pourtant la cystéine 10, qui n'est pas palmitoylable, permet la co-immunoprécipitation. La cystéine 11 palmitoylable doit avoir un autre rôle.

IV – Conclusion et perspectives

Au laboratoire, de nombreux partenaires potentiels de la protéine N-STOP ont été identifiés, tels que Arc, NSG2, KIP et Tctex1. SL21 et N-STOP partageant de nombreuses caractéristiques et modes d'action, nous avons supposé que SL21 pourrait posséder des partenaires communs avec la N-STOP. Un test en double-hybride ciblé (les protéines cibles étant les partenaires déjà identifiés de la N-STOP) a donc été réalisé. Seule la protéine Tctex1, a été mise en évidence comme partenaire de SL21. Pour confirmer ce résultat, nous avons montré que SL21 co-immunoprécipite avec Tctex1, après surexpression dans des cellules non-neuronales. Il est maintenant important de revenir à des conditions plus physiologiques pour tester l'interaction Tctex1/SL21. La distribution et la co-localisation de SL21 et de Tctex1 endogènes pourront être testées en immunofluorescence sur des cultures de neurones hippocampiques de souris. L'interaction SL21/Tctex1 endogène pourra aussi être validée par co-immunoprécipitation à partir d'extraits de neurones hippocampiques en culture ou à partir de lysats de cerveaux.

Des tests double-hybrides ont également mis en évidence une interaction de SL21 avec elle-même et avec les STOPS neuronales. Au cours de ce travail, nous avons validé la multimerisation de SL21 par des expériences de co-immunoprécipitation à partir de lysats de cellules sur-exprimant SL21. L'interaction de SL21 et des STOPS neuronales a aussi été validée par co-immunoprécipitation après sur-expression dans des cellules non-neuronales. Cette interaction a été vérifiée sur les protéines endogènes par co-immunoprécipitation à partir de lysats de neurones hippocampiques en culture. La suite de notre travail s'est concentrée sur l'interaction de SL21 avec elle-même. Par des expériences de co-immunoprécipitation à partir d'extraits de cellules sur-exprimant SL21 et différents mutants de délétions, nous avons montré que le domaine de multimerisation de SL21 se localise au niveau de la région amino-terminale. Comme nous l'avons mis en évidence au chapitre 1, le domaine amino-terminal contient la zone de palmitoylation de SL21. Les expériences réalisées jusqu'à présent ne permettent pas de conclure clairement l'implication potentielle de la palmitoylation dans cette interaction. Une réponse

intéressante à ce propos sera apportée par l'étude de la multimérisation de SL21 après production chez la bactérie, cette dernière ne contient pas d'enzymes de palmitoylation (expériences sont en cours). Soit une interaction de SL21 avec elle-même est observée : la palmitoylation ne jouera pas le rôle que nous lui avons prédit. Soit aucune multimérisation de SL21 n'est observée et nous devrons apporter l'activité palmitoyl acyl transférase (PAT) de façon exogène. Nous possédons au laboratoire les ADNc des PATs ayant une activité sur SL21. La protéine SL21 et ses PATs, produites séparément dans la bactérie, seront mélangées en présence d'iodopalmitate Coenzyme-A radioactif (Buglino et Resh, 2008). La nature du complexe formé par SL21 (dimère, multimère) pourra alors être étudiée.

Et également, ces résultats sur l'interaction de SL21 avec elle-même et avec les protéines N- et E-STOP laissent imaginer la présence de complexes protéiques dans lesquelles STOPS et SL21 seraient présentes. Une étude de ces complexes pourrait être réalisée par microscopie électronique et par SDS-PAGE couplée à la spectroscopie de masse et éventuellement nous permettrait d'observer si ces complexes se localisent au niveau de structures, telles que les MTs ou les membranes.

Discussion

Les microtubules (MTs) sont des éléments fibreux présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Ils forment un réseau qui adopte une grande variété d'organisations spatiales, dépendantes en grande partie de la dynamique des MTs et de leurs interactions avec des effecteurs protéiques. Dans les neurones, la majorité des microtubules présente un état de stabilité particulier, caractérisé par une résistance aux facteurs dépolymérisants comme le froid ou des drogues telles que le nocodazole. Le laboratoire a montré que la stabilisation au froid des MTs est due à l'action d'une famille de protéines régulées par la calmoduline, les protéines STOPs.

Les protéines STOPs sont des protéines associées aux MTs (MAP). Au niveau neuronal, deux isoformes spécifiques ont été caractérisées, une isoforme précoce E-STOP (Guillaud *et al.*, 1998) et une isoforme adulte N-STOP (Bosc *et al.*, 1996). L'étude structure-fonction des protéines STOPs a permis la définition de modules fonctionnels d'interaction avec les MTs et la calmoduline (Bosc *et al.*, 2001). La caractérisation de ces modules fonctionnels a permis d'identifier dans les banques de données une protéine apparentée à la protéine N-STOP. Cette protéine a été nommée SL21. SL21 possède deux régions d'homologie avec les protéines STOPs neuronales. La première correspond au module Mn3 et la seconde aux 35 premiers acides aminés de l'extrémité amino-terminale (Figure 59).

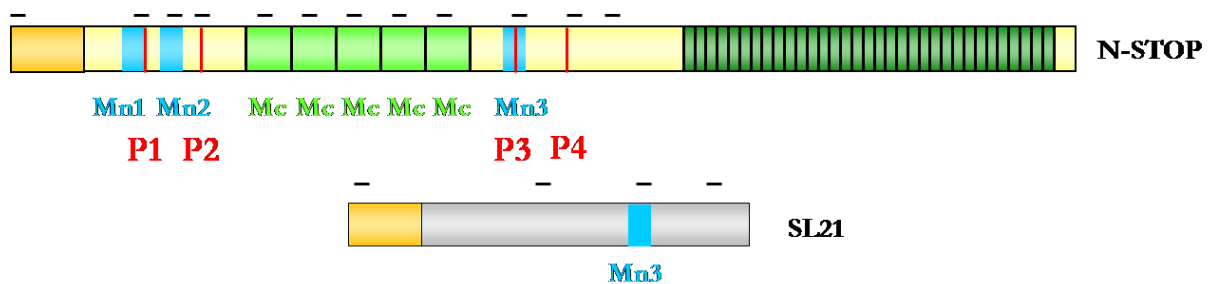


Figure 59 : Représentation schématique des protéines N-STOP et SL21. La protéine N-STOP possède 8 modules de liaison et de stabilisation des microtubules, des modules **Mn** (Mn1 à Mn3) et des modules **Mc** (A). Le domaine amino-terminal représenté en jaune est un domaine partagé par la N-STOP et SL21. Le gène codant pour SL21 est composée de 3 exons (1, 2, 3). SL21 contient un domaine de liaison aux MTs. Sites de liaison à la calmoduline (-) et sites de phosphorylation par la CaMKII (P).

L'ADNc de SL21 a été cloné et la caractérisation des domaines homologues aux protéines STOPs a débuté. Le module Mn3 de SL21, comme celui des STOPs, lie les MTs *in vitro* (Gory-Fauré *et al.*, 2006 ; Guillaud *et al.* 1998 ; Bosc *et al.* 1996). Après transfection de l'ADNc complet de SL21 dans des cellules HeLa (cellules dépourvues de microtubules stables), le réseau

microtubulaire résiste à une exposition au froid et à la dépolymérisation induite par le nocodazole. En revanche, la transfection de SL21 délétée du module Mn3 ne permet plus aux microtubules de résister à ces mêmes conditions (Gory-Fauré *et al.*, 2006). Le module Mn3 de SL21 est responsable de ses propriétés de stabilisation des MTs dans des conditions dépolymérisantes. Après transfection dans des cellules telles que les cellules fibroblastiques NIH-3T3 et à fort taux d'expression, SL21 se localise au niveau des MTs. A faible taux d'expression, SL21 se situe au niveau de l'appareil de Golgi.

Le rôle de la région amino-terminale très conservée entre N-STOP et SL21, quant à elle, restait à élucider ; ce fut le principal objectif de ma thèse. Nos résultats montrent que la région amino-terminale de SL21, et plus particulièrement la cystéine 5, est responsable de sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi. Nous avons également montré le rôle du domaine amino-terminal dans la localisation des STOPS neuronales, au niveau de l'appareil de Golgi. Comme SL21, à faible taux d'expression, N-STOP se situe au niveau de l'appareil de Golgi et à un taux d'expression plus important, elle présente une localisation supplémentaire au niveau des MTs. Les protéines SL21 et N-STOP possèdent une localisation sub-cellulaire similaire mais leur localisation dans les neurones en culture diffère :

- SL21 est située spécifiquement au niveau de l'appareil de Golgi somatique dès le début de son expression (DIV6). A des stades de différenciation plus avancés (> DIV 15), SL21 est toujours présente au niveau de l'appareil de Golgi somatique mais aussi de façon ponctuelle dans les extensions neuritiques. Dans des neurones en culture âgés (DIV30), le Golgi somatique n'est plus marqué, le marquage ponctué persiste.

- la protéine N-STOP, quand à elle, se localise majoritairement au niveau des microtubules dès qu'elle est exprimée (DIV 7), quel que soit le stade de différenciation des neurones en culture.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les différences de localisation des protéines N-STOP et SL21 endogènes observées dans les neurones :

- les protéines STOPS contiennent un nombre important de modules de liaison aux MTs qui leur permettent de se concentrer au niveau des MTs. Les MTs étant des composants majeurs du soma dendritique, la concentration des STOPS à leur niveau pourrait masquer leur localisation au Golgi.

- Le nombre de liaison aux MTs des STOPS est supérieur à celui de SL21 (8 versus 1) et pourrait expliquer l'affinité plus importante des STOPS pour les MTs.

- dans les neurones, la protéine N-STOP est fortement exprimée alors que SL21 est une protéine beaucoup moins abondante (Guillaud *et al.*, 1998 ; Gory-Fauré *et al.*, 2006). La

localisation de SL21 et de la N-STOP dépendrait alors de leur taux d'expression avec tout d'abord une localisation au niveau du Golgi puis sur les microtubules.

- des régulations cellulaires (phosphorylations par la CaMKII, liaison à la calmoduline, palmitoylation ou interactions avec d'autres protéines) peuvent localiser différemment les protéines SL21 et N-STOP.

La présence de protéines capables à la fois de lier les microtubules et le Golgi dans les neurones pourrait avoir un rôle important pour la voie de sécrétion neuronale. L'appareil de Golgi somatique, dans les neurones, présente une organisation similaire à celui des cellules non-neuronales. Sa localisation est périnucléaire et dépend de son interaction avec les microtubules (Thyberg and Moskalewski, 1999). Les neurones, cellules polarisées et de morphologie complexe, possèdent également des vésicules fonctionnelles de Golgi mobiles ou « outposts de Golgi », localisées tout au long de certaines dendrites (Horton and Ehlers 2003 a et b). Un système de sécrétion complet et fonctionnel (système de sécrétion satellite) a également été mis en évidence au niveau des extensions dendritiques (Torre and Steward, 1992 ; Eberwine *et al.*, 2001 ; Raab-Graham *et al.*, 2006). Nous pouvons alors imaginer que SL21, se localisant à la fois au niveau de l'appareil de Golgi somatique et au niveau de vésicules mobiles pourrait jouer un rôle au cours du trafic et/ou dans le positionnement des « outposts de Golgi » le long des dendrites, en utilisant sa capacité à lier le Golgi et les microtubules. Ces « outposts de Golgi » seraient impliqués dans la maturation de protéines transcrites localement et dans la croissance dendritique, via sa capacité à apporter des membranes aux extrémités (Steward et Schumann, 2003 ; Horton *et al.*, 2005 ; Ehlers *et al.*, 2007). L'hypothèse d'implication de SL21 dans le transport des « outposts de Golgi » est confortée par l'identification, au cours de ce travail, de la protéine Tctex1 comme partenaire de SL21. La protéine Tctex1 est une des sous-unités de la dynéine, moteur moléculaire notamment impliqué dans le positionnement de l'appareil de Golgi (Allan *et al.*, 2002). Notons que la protéine Lava lamp (Lva) de drosophile est une protéine cytosquelettique, capable de lier à la fois le Golgi et la dynéine. L'inhibition aigüe de Lva entraîne un mauvais positionnement des « outposts de Golgi » au sein des dendrites et également une diminution de la longueur et du nombre de branchements dendritiques (Papoulas *et al.*, 2005). SL21 pourrait jouer un rôle comparable à la protéine Lva dans les neurones, chez les Vertébrés. Il serait alors intéressant de comparer la distribution et le nombre d'« outposts de Golgi » ainsi que le nombre de branchements dendritiques dans les neurones d'hippocampe de souris sauvage et de souris déficientes en protéine SL21 (voir paragraphe suivant). Les « outposts de Golgi » pourront être visualisés et suivis par vidéomicroscopie, après transfection de la Galactosyl-Transférase couplée à EYFP, marqueur utilisé pour les observer (Ye *et al.*, 2007).

Par la suite, nous avons montré que la palmitoylation de SL21 et de N-STOP est responsable de leur localisation au niveau du Golgi. Cette palmitoylation pourrait être impliquée dans l'interaction de SL21 avec elle-même ainsi que dans l'interaction de SL21 avec les STOPS neuronales. La palmitoylation est une modification qui permet l'ancrage des protéines aux membranes, régule le trafic et le repliement des protéines neuronales, ainsi que le regroupement de récepteurs au sein de la synapse (El-Husseini and Bredt, 2002). La palmitoylation de SL21 pourrait lui permettre de lier le Golgi mais également les vésicules nécessaires à la formation des « outposts de Golgi » qui en bourgeonnent (Teng *et al.*, 2008). La palmitoylation de la protéine N-STOP, quant à elle, pourrait impliquer la N-STOP, comme la protéine synapsine, dans la régulation des pools de vésicules synaptiques. La synapsine est impliquée dans la formation et le maintien du pool vésiculaire de réserve, lui-même important pour l'efficacité synaptique (Hilfiker *et al.*, 1999). Les protéines N-STOP et synapsine sont capables d'interagir avec les membranes et avec l'actine. Leur phosphorylation par la CaMKII module ces interactions (Fdez *et al.*, 2006 ; Baratier *et al.*, 2006). Les souris invalidées pour le gène codant pour la synapsine ou pour le gène *stop* comportent un pool de vésicules réduit ainsi qu'un défaut de plasticité (Li *et al.*, 1995 ; Andrieux *et al.*, 2002). L'analyse en microscopie électronique de marqueurs spécifiques d'un compartiment synaptique donné, associé à un marquage des STOPS, permettrait de préciser la localisation de la STOP à la synapse. Il serait aussi important de comparer la localisation de la STOP dans des tranches de cerveau de souris activées ou non par une stimulation téтанique forte, afin de mimer une potentialisation à long terme. De même, il serait intéressant de réintroduire, dans des neurones STOP KO en culture, une forme palmitoylable (forme sauvage) ou non (forme mutée) de N-STOP. Nous pourrions alors observer si l'expression de N-STOP restaure le pool vésiculaire des neurones KO STOP puis déterminer l'importance de la palmitoylation dans cette restauration.

Nous avons poursuivi la caractérisation de SL21, en abordant l'analyse de sa fonction en menant parallèlement l'invalidation de son gène *in vivo* et l'étude de ses partenaires. En bloquant par RNA-interférence l'expression de SL21 dans des neurones en culture, nous avons observé une létalité importante dès 24h après la transfection. Mais les résultats obtenus dans des systèmes *in vitro* sont difficilement extrapolables à leur action *in vivo*. A titre d'exemple, l'inhibition aiguë des protéines STOPS avait produit une inhibition de l'extension neuritique dans des cellules PC12 transfectées (Guillaud *et al.*, 1998). Or les souris déficientes en protéines STOPS sont viables et le phénotype observé *in vitro* par RNAi n'a pas été confirmé dans le cerveau des souris KO STOP : la formation des extensions neuritiques est normale. Cette différence de conséquences de

l'inhibition des protéines STOPs dans les cellules ou dans l'animal peut s'expliquer par une adaptation génétique de l'animal avec une compensation par les autres MAPs structurales.

Afin d'appréhender de manière plus précise le rôle de SL21 dans l'animal entier, nous avons décidé de produire des souris invalidées pour le gène *sl21* (souris KO SL21). Les animaux KO SL21 sont viables et fertiles. Il est difficile de prévoir leur phénotype. Nous pouvons imaginer que l'activité de SL21 pourrait être compensée par celle de STOP ou que l'activité de STOP pourrait être compensée partiellement par celle de SL21. Les protéines SL21 et STOPs ont une structure similaire, organisée en domaines fonctionnels chevauchés par des domaines de liaison à la calmoduline. Même si STOP et SL21 présentent de fortes homologues [affinité duale pour les MTs et pour les membranes, interaction avec des partenaires communs (Tctex1, calmoduline)], elles ont des caractéristiques propres. La protéine N-STOP interagit avec l'actine et est phosphorylée par la CaMKII, enzyme clé de la plasticité synaptique (Baratier *et al.*, 2006). Ces propriétés ne sont pas retrouvées pour SL21. Il est également important de noter qu'aucune augmentation d'expression de SL21 n'est observée chez les souris KO STOP (Communication personnelle, J.Brocard). Les MTs des neurones issus de souris KO STOP dépolymérisent lorsqu'ils sont exposés au froid. Cela signifie que dans ce contexte, SL21 ne compense pas l'activité de stabilisation des MTs des protéines STOPs. Au vu de ces observations, N-STOP et SL21 peuvent subir des régulations cellulaires différentes qui pourraient expliquer des fonctions différentes dans les neurones. La réponse à nos interrogations vis-à-vis du rôle de SL21 par rapport à N-STOP ou inversement, nous sera apportée par la caractérisation de souris doublement déficientes en protéines STOP et SL21. Les croisements permettant d'obtenir ces souris sont en cours au laboratoire.

Le rôle physiologique de SL21 a aussi été abordé par l'étude de ses partenaires. En utilisant la technique de double-hybride chez la levure, il a été montré que Tctex1 interagit avec SL21. Notre travail a permis de valider cette interaction par co-immunoprécipitation après surexpression dans les cellules non-neuronales. Tctex1 est également un partenaire de la N-STOP (communication personnelle, F. Dufour). Une étude récente montre que la protéine Tctex1 aurait un rôle indépendant du moteur moléculaire dynéine. Tctex1, non lié à la dynéine, interagit directement et sélectivement avec les canaux calciques voltage-dépendants (canaux VGCCs) de type N et P/Q. Ces canaux sont des composants importants des terminaisons pré-synaptiques. Ils sont impliqués dans la maturation des synapses et dans le relargage des neurotransmetteurs, et donc dans la plasticité synaptique. L'interaction de Tctex1 avec les canaux VGCCs de type N et P/Q module leur adressage et leur ancrage au niveau de la zone active de la synapse, jouant alors un rôle sur les courants calciques (Lai *et al.*, 2005). Il est alors tout à fait envisageable que SL21

et/ou STOP, par leur capacité à lier les MTs et Tctex1 participent à l'acheminement de ces canaux à la surface synaptique. Il serait intéressant de mesurer la densité du courant calcique par patch-clamp sur des neurones de souris sauvages après un traitement permettant de bloquer spécifiquement chaque type de canal et de la comparer à celle des neurones d'hippocampe de souris KO SL21 ou KO STOP. Cette analyse nous permettrait de rapprocher la fonctionnalité de Tctex1 avec celle de SL21 et STOP. Des études préliminaires ont montré une réduction de moitié de la densité de courant calcique dans les neurones hippocampiques issus de souris KO STOP par rapport aux souris sauvages (communication personnelle, F. Dufour et C. Arnoult). Une quantification par immunomarquage des canaux calciques de types N et P/Q dans ces cellules est en cours.

Au niveau pré-synaptique, les travaux sur le rôle du cytosquelette dans l'organisation fonctionnelle de la synapse rapportent, pour la plupart, des expériences sur le réseau d'actine. L'actine y est présente et participe au trafic vésiculaire, au contrôle de la concentration des vésicules à la synapse ou encore à l'organisation de protéines régulatrices de l'exocytose (Sankaranarayanan *et al.*, 2003). Au niveau post-synaptique, l'actine serait aussi cruciale pour les mécanismes de plasticité (Fukazawa *et al.*, 2003). Il est possible d'imaginer que les MTs ou/et leur protéines effectrices, telles que les différents membres de la famille des STOPs pourraient participer de la même manière à l'organisation fonctionnelle de la synapse. La présence de MTs dans les boutons synaptiques axonaux ou dans les épines dendritiques n'avait pas été montrée de manière claire. Très récemment, Mitsuyama et ses collaborateurs ont mis en évidence, par microscopie électronique, la présence de MTs au niveau des dendrites à la suite d'une stimulation tétanique de potentialisation à long terme (Mitsuyama *et al.*, 2008). Il est alors possible d'imaginer qu'un réseau microtubulaire pourrait être présent de manière transitoire au sein des synapses, que ce soit au niveau de l'élément pré-synaptique ou au niveau de l'élément post-synaptique. C'est alors sous sa fonction de protéine associée aux MTs que la famille des STOPs agirait au niveau de la synapse. Les MTs localisés le long des axones ou des dendrites pénétreraient de façon transitoire dans les épines dendritiques ou dans les zones actives pré-synaptiques pour transporter à la synapse des éléments clés pour la neurotransmission (membrane, vésicules). Cette activité serait rendue possible par la stabilisation des MTs par la famille des STOPs. Alternativement, les protéines de la famille des STOPs passeraient d'un état lié aux MTs à un état non-associé aux MTs après activation par le complexe Ca^{2+} /calmoduline (tous les domaines fonctionnels des protéines de la famille des STOPs sont chevauchants avec un site de liaison à la calmoduline). Elles deviendraient alors capables de s'associer à différentes structures synaptiques : actine, membranes, densités post-synaptiques, etc. Par ailleurs, des séparations sur gel PAGE des

protéines de synaptosomes totaux de souris ont montré que N-STOP est une protéine synaptique, préférentiellement associée aux structures synaptiques insolubles comme la PSD (Andrieux *et al.*, 2002). Nous avons aussi montré par des expériences de co-immunoprécipitation, que la protéine N-STOP interagit avec PSD-95, protéine majeure de la PSD, à partir de lysats de cellules sur-exprimant N-STOP et PSD-95-GFP, mais également à partir d'extraits de neurones primaires en culture. Ces données associées aux résultats d'Elias et collaborateurs montrant que PSD95 est impliquée dans le trafic d'un des récepteurs au glutamate, le récepteur de type AMPA, nous permettent de mieux imaginer le rôle de N-STOP dans la plasticité synaptique (Elias *et al.*, 2006). Etant donné que le nombre de récepteurs AMPA à la membrane est important pour la plasticité synaptique, une dérégulation de l'adressage des récepteurs AMPA à la PSD, en l'absence de STOPs pourrait expliquer les défauts de plasticité synaptique observés chez les souris KO STOP. Il serait donc intéressant de mesurer le trafic des récepteurs AMPA après transfection d'une sous-unité fusionnée à la GFP dans des neurones primaires de souris sauvage et KO STOP. Ces données pourront être corrélées avec l'observation du grossissement des épines dendritiques activées en couplant microscopie bi-photonique en temps réel et électrophysiologie (Yang *et al.*, 2008). Cette technique permet de différencier une épine stimulée d'une épine non-stimulée et de mesurer sa variation de volume, concomitante à la stimulation. Nous pourrions alors comparer la taille des épines dendritiques de neurones hippocampiques de souris sauvage et KO STOP après stimulation. Des résultats concordants lors de ces observations permettraient de déterminer le paramètre précis de plasticité synaptique déficient chez les souris KO STOP.

L'hypothèse concernant la présence de MTs et protéines associées au sein de la synapse rejoint les données obtenues sur les souris KO STOP. Ces souris KO STOP présentent, en effet, des troubles de la transmission synaptique complexe (LTP et LTD) associés à une réduction du nombre de vésicules synaptiques des neurones glutamatergiques. Elles présentent également des troubles sévères du comportement (anxiété, activité fragmentée, comportement social anormal). Les défauts de neuro-transmission et les défauts comportementaux observés chez les souris KO STOP sont compatibles avec les déficits observés dans la schizophrénie. Un traitement aux neuroleptiques (utilisés en thérapie humaine de la schizophrénie) est capable d'améliorer certains défauts comportementaux et certains défauts de plasticité (Andrieux *et al.*, 2002 ; Brun *et al.*, 2005). Ces résultats associés à la localisation du gène *stop* humain dans un locus de susceptibilité à la schizophrénie (11q14) ont permis de proposer les souris KO STOP comme un modèle animal d'étude de la schizophrénie. Des altérations du gène codant pour la protéine DISC-1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) et du gène codant pour la dysbindine-1, ont été rapportées dans des cas de schizophrénie chez l'homme. DISC-1 est une protéine associée au centrosome capable d'interagir

avec des protéines associées aux MTs, telles MAP1A, MIPT3 ou Nudel. La dysbindine-1 est capable de lier et de stabiliser les MTs. Ces données, en cohérence avec le modèle KO STOP mettent en lumière un lien entre des troubles de l'organisation fonctionnelle du cytosquelette neuronal et les maladies psychiatriques (Mirmics *et al.*, 2001 ; Frankle *et al.*, 2003 ; Owen *et al.*, 2005). Ce lien est conforté par l'amélioration de la transmission synaptique et du comportement des souris KO STOP par l'administration de l'épothilone D, stabilisateurs des MTs (Andrieux *et al.*, 2006).

Il ne fait aucun doute que les modèles murins développés dans le laboratoire (souris Ko STOP, souris KO SL21 et KO STOP / SL21) constitueront un outil de choix pour mettre en lumière les mécanismes moléculaires sous-jacents de la schizophrénie et des pathologies mentales associées.

A

- Aguezoul M, Andrieux A, Denarier E. 2003. Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). *Genomics* 81(6):623-627.
- Ahmad FJ, Joshi HC, Centonze VE, Baas PW. 1994. Inhibition of microtubule nucleation at the neuronal centrosome compromises axon growth. *Neuron* 12(2):271-280.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ. 2000. Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nature neuroscience* 3(5):445-451.
- Akhmanova A, Hoogenraad CC, Drabek K, Stepanova T, Dortland B, Verkerk T, Vermeulen W, Burgering BM, De Zeeuw CI, Grosveld F, Galjart N. 2001. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* 104(6):923-935.
- Akhmanova A, Steinmetz MO. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews* 9(4):309-322.
- Alexander JE, Hunt DF, Lee MK, Shabanowitz J, Michel H, Berlin SC, MacDonald TL, Sundberg RJ, Rebhun LI, Frankfurter A. 1991. Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(11):4685-4689.
- Allan VJ, Thompson HM, McNiven MA. 2002. Motoring around the Golgi. *Nature cell biology* 4(10):E236-242.
- Andrieux A, Job D. 2003. [A role for the cytoskeleton in mental diseases?]. *Med Sci (Paris)* 19(2):135-137.
- Andrieux A, Salin P, Schweitzer A, Begou M, Pachoud B, Brun P, Gory-Faure S, Kujala P, Suaud-Chagny MF, Hofle G, Job D. 2006. Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 60(11):1224-1230.
- Andrieux A, Salin PA, Job D. 2004. [A role for microtubules in mental diseases?]. *Pathol Biol (Paris)* 52(2):89-92.
- Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Fauré S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, Job D. 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 16(18):2350-2364.
- Antonova I, Arancio O, Trillat AC, Wang HG, Zablow L, Udo H, Kandel ER, Hawkins RD. 2001. Rapid increase in clusters of presynaptic proteins at onset of long-lasting potentiation. *Science (New York, NY)* 294(5546):1547-1550.
- Antonsson B, Lutjens R, Di Paolo G, Kassel D, Allet B, Bernard A, Catsicas S, Grenningloh G. 1997. Purification, characterization, and in vitro phosphorylation of the neuron-specific membrane-associated protein SCG10. *Protein Expr Purif* 9(3):363-371.
- Arnal I, Heichette C, Diamantopoulos GS, Chretien D. 2004. CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol* 14(23):2086-2095.
- Arni S, Keilbaugh SA, Ostermeyer AG, Brown DA. 1998. Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *The Journal of biological chemistry* 273(43):28478-28485.
- Audebert S, Desbruyeres E, Gruszczynski C, Koulakoff A, Gros F, Denoulet P, Edde B. 1993. Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. *Molecular biology of the cell* 4(6):615-626.
- Audebert S, Koulakoff A, Berwald-Netter Y, Gros F, Denoulet P, Edde B. 1994. Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *J Cell Sci* 107 (Pt 8):2313-2322.

B

- Baas PW, Black MM. 1989. Compartmentation of alpha-tubulin in neurons: identification of a somatodendritic-specific variant of alpha-tubulin. *Neuroscience* 30(3):795-803.

- Baas PW, Pienkowski TP, Cimbalka KA, Toyama K, Bakalis S, Ahmad FJ, Kosik KS. 1994. Tau confers drug stability but not cold stability to microtubules in living cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 1):135-143.
- Baas PW, Qiang L. 2005. Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock. *Trends in cell biology* 15(4):183-187.
- Baas PW, Slaughter T, Brown A, Black MM. 1991. Microtubule dynamics in axons and dendrites. *J Neurosci Res* 30(1):134-153.
- Badin-Larcon AC, Boscheron C, Soleilhac JM, Piel M, Mann C, Denarier E, Fourest-Lieuvin A, Lafanechere L, Bornens M, Job D. 2004. Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(15):5577-5582.
- Bähler M, Greengard P. 1987. Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature* 326(6114):704-707.
- Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. 2003. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nature neuroscience* 6(12):1277-1283.
- Baker MW, Macagno ER. 2007. In vivo imaging of growth cone and filopodial dynamics: evidence for contact-mediated retraction of filopodia leading to the tiling of sibling processes. *J Comp Neurol* 500(5):850-862.
- Bamburg JR, Bray D, Chapman K. 1986. Assembly of microtubules at the tip of growing axons. *Nature* 321(6072):788-790.
- Banerjee A. 2002a. Coordination of posttranslational modifications of bovine brain alpha-tubulin. Polyglycylation of delta2 tubulin. *The Journal of biological chemistry* 277(48):46140-46144.
- Banerjee A. 2002b. Increased levels of tyrosinated alpha-, beta(III)-, and beta(IV)-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1):598-601.
- Baratier J, Peris L, Brocard J, Gory-Faure S, Dufour F, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Blanchoin L, Salin P, Job D, Andrieux A. 2006. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *The Journal of biological chemistry* 281(28):19561-19569.
- Barra HS, Arce CA, Argarana CE. 1988. Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol Neurobiol* 2(2):133-153.
- Barria A, Derkach V, Soderling T. 1997a. Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *The Journal of biological chemistry* 272(52):32727-32730.
- Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR. 1997b. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science (New York, NY)* 276(5321):2042-2045.
- Baudier J, Cole RD. 1987. Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *The Journal of biological chemistry* 262(36):17577-17583.
- Bayer KU, De Koninck P, Leonard AS, Hell JW, Schulman H. 2001. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 411(6839):801-805.
- Begou M, Brun P, Bertrand JB, Job D, Schweitzer A, D'Amato T, Saoud M, Andrieux A, Suaud-Chagny MF. 2007. Post-pubertal emergence of alterations in locomotor activity in stop null mice. *Synapse* 61(9):689-697.
- Bergen LG, Borisy GG. 1980. Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *The Journal of cell biology* 84(1):141-150.
- Bergeron C, Beric-Maskarel K, Muntasser S, Weyer L, Somerville MJ, Percy ME. 1994. Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 53(3):221-230.
- Bernhardt R, Matus A. 1982. Initial phase of dendrite growth: evidence for the involvement of high molecular weight microtubule-associated proteins (HMWP) before the appearance of tubulin. *The Journal of cell biology* 92(2):589-593.
- Berrueta L, Kraeft SK, Tirnauer JS, Schuyler SC, Chen LB, Hill DE, Pellman D, Bierer BE. 1998. The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle

- microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(18):10596-10601.
- Berthiaume L, Resh MD. 1995. Biochemical characterization of a palmitoyl acyltransferase activity that palmitoylates myristoylated proteins. *The Journal of biological chemistry* 270(38):22399-22405.
- Bharadwaj M, Bizzozero OA. 1995. Myelin P0 glycoprotein and a synthetic peptide containing the palmitoylation site are both autoacylated. *Journal of neurochemistry* 65(4):1805-1815.
- Bieche I, Maucuer A, Laurendeau I, Lachkar S, Spano AJ, Frankfurter A, Levy P, Manceau V, Sobel A, Vidaud M, Curmi PA. 2003. Expression of stathmin family genes in human tissues: non-neural-restricted expression for SCLIP. *Genomics* 81(4):400-410.
- Bielas SL, Serneo FF, Chechlacz M, Deerinck TJ, Perkins GA, Allen PB, Ellisman MH, Gleeson JG. 2007. Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell* 129(3):579-591.
- Binder LI, Frankfurter A, Kim H, Caceres A, Payne MR, Rebhun LI. 1984. Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(17):5613-5617.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of cell biology* 101(4):1371-1378.
- Bizzozero OA, Bixler HA, Davis JD, Espinosa A, Messier AM. 2001. Chemical deacylation reduces the adhesive properties of proteolipid protein and leads to decompaction of the myelin sheath. *Journal of neurochemistry* 76(4):1129-1141.
- Black MM, Baas PW, Humphries S. 1989. Dynamics of alpha-tubulin deacetylation in intact neurons. *J Neurosci* 9(1):358-368.
- Black MM, Cochran JM, Kurdyla JT. 1984. Solubility properties of neuronal tubulin: evidence for labile and stable microtubules. *Brain Res* 295(2):255-263.
- Black MM, Slaughter T, Fischer I. 1994. Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *J Neurosci* 14(2):857-870.
- Blackstone C, Sheng M, MJo B. 1999. Protein targeting and calcium signaling microdomains in neuronal cells. *Cell Calcium* 26(5):181-192.
- Blackwood DH, Pickard BJ, Thomson PA, Evans KL, Porteous DJ, Muir WJ. 2007. Are some genetic risk factors common to schizophrenia, bipolar disorder and depression? Evidence from DISC1, GRIK4 and NRG1. *Neurotox Res* 11(1):73-83.
- Bondallaz P, Barbier A, Soehrman S, Grenningloh G, Riederer BM. 2006. The control of microtubule stability in vitro and in transfected cells by MAP1B and SCG10. *Cell motility and the cytoskeleton* 63(11):681-695.
- Bonhoeffer T, Yuste R. 2002. Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron* 35(6):1019-1027.
- Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, Larcher JC. 2001. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *The Journal of biological chemistry* 276(16):12839-12848.
- Bonnet C, Denarier E, Bosc C, Lazereg S, Denoulet P, Larcher JC. 2002. Interaction of STOP with neuronal tubulin is independent of polyglutamylation. *Biochem Biophys Res Commun* 297(4):787-793.
- Bosc C, Andrieux A, Job D. 2003. STOP proteins. *Biochemistry* 42(42):12125-12132.
- Bosc C, Cronk JD, Pirollet F, Watterson DM, Haiech J, Job D, Margolis RL. 1996. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(5):2125-2130.
- Bosc C, Frank R, Denarier E, Ronjat M, Schweitzer A, Wehland J, Job D. 2001. Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. *The Journal of biological chemistry* 276(33):30904-30913.
- Bosc C, Oenarier E, Andrieux A, Job D. 1999. STOP proteins. *Cell Struct Funct* 24(5):393-399.
- Bouvrais-Veret C, Weiss S, Andrieux A, Schweitzer A, McIntosh JM, Job D, Giros B, Martres MP. 2007. Sustained increase of alpha7 nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice. *Neuropharmacology* 52(8):1691-1700.

- Bouvrais-Veret C, Weiss S, Hanoun N, Andrieux A, Schweitzer A, Job D, Hamon M, Giros B, Martres MP. 2008. Microtubule-associated STOP protein deletion triggers restricted changes in dopaminergic neurotransmission. *Journal of neurochemistry* 104(3):745-756.
- Brady ST, Tytell M, Lasek RJ. 1984. Axonal tubulin and axonal microtubules: biochemical evidence for cold stability. *The Journal of cell biology* 99(5):1716-1724.
- Brandt R, Leger J, Lee G. 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *The Journal of cell biology* 131(5):1327-1340.
- Bre MH, Redeker V, Vinh J, Rossier J, Levilliers N. 1998. Tubulin polyglycylation: differential posttranslational modification of dynamic cytoplasmic and stable axonemal microtubules in paramecium. *Molecular biology of the cell* 9(9):2655-2665.
- Bredt DS, Nicoll RA. 2003. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40(2):361-379.
- Brugg B, Matus A. 1991. Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *The Journal of cell biology* 114(4):735-743.
- Brun P, Begou M, Andrieux A, Mouly-Badina L, Clerget M, Schweitzer A, Scarna H, Renaud B, Job D, Suaud-Chagny MF. 2005. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *Journal of neurochemistry* 94(1):63-73.
- Budde C, Schoenfish MJ, Linder ME, Deschenes RJ. 2006. Purification and characterization of recombinant protein acyltransferases. *Methods* 40(2):143-150.
- Buglino JA, Resh MD. 2008. Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of sonic hedgehog. *The Journal of biological chemistry* 283(32):22076-22088.
- Burkhardt JK, Echeverri CJ, Nilsson T, Vallee RB. 1997. Overexpression of the dynamin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *The Journal of cell biology* 139(2):469-484.
- Busch KE, Hayles J, Nurse P, Brunner D. 2004. Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Developmental cell* 6(6):831-843.

C

- Caceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M. 1984. MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res* 315(2):314-318.
- Caceres A, Kosik KS. 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343(6257):461-463.
- Camp LA, Hofmann SL. 1993. Purification and properties of a palmitoyl-protein thioesterase that cleaves palmitate from H-Ras. *The Journal of biological chemistry* 268(30):22566-22574.
- Carlier MF. 1991. Actin: protein structure and filament dynamics. *The Journal of biological chemistry* 266(1):1-4.
- Carlier MF, Pantaloni D. 1981. Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* 20(7):1918-1924.
- Caron JM. 1997. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies. *Molecular biology of the cell* 8(4):621-636.
- Carvalho P, Gupta ML, Jr., Hoyt MA, Pellman D. 2004. Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Developmental cell* 6(6):815-829.
- Cassimeris L. 2002. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* 14(1):18-24.
- Cassimeris L, Pryer NK, Salmon ED. 1988. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *The Journal of cell biology* 107(6 Pt 1):2223-2231.
- Caudron N, Arnal I, Buhler E, Job D, Valiron O. 2002. Microtubule nucleation from stable tubulin oligomers. *The Journal of biological chemistry* 277(52):50973-50979.
- Challacombe JF, Snow DM, Letourneau PC. 1997. Dynamic microtubule ends are required for growth cone turning to avoid an inhibitory guidance cue. *J Neurosci* 17(9):3085-3095.
- Charbaut E, Curmi PA, Ozon S, Lachkar S, Redeker V, Sobel A. 2001. Stathmin family proteins display specific molecular and tubulin binding properties. *The Journal of biological chemistry* 276(19):16146-16154.
- Chauvin S, Poulain FE, Ozon S, Sobel A. 2008. Palmitoylation of stathmin family proteins domain A controls Golgi vs mitochondrial subcellular targeting. *Biol Cell*.

- Chen CA, Manning DR. 2000. Regulation of α i palmitoylation by activation of the 5-hydroxytryptamine-1A receptor. *The Journal of biological chemistry* 275(31):23516-23522.
- Chen J, Lipska BK, Weinberger DR. 2006. Genetic Mouse Models of Schizophrenia: From Hypothesis-Based To Susceptibility Gene-Based Models. *Biol Psychiatry*.
- Chi P, Greengard P, Ryan TA. 2001. Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. *Nature neuroscience* 4(12):1187-1193.
- Cho JH, Johnson GV. 2003. Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *The Journal of biological chemistry* 278(1):187-193.
- Cho S, Dawson G. 2000. Palmitoyl protein thioesterase 1 protects against apoptosis mediated by Ras-Akt-caspase pathway in neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry* 74(4):1478-1488.
- Christopherson KS, Sweeney NT, Craven SE, Kang R, El-Husseini Ael D, Brecht DS. 2003. Lipid- and protein-mediated multimerization of PSD-95: implications for receptor clustering and assembly of synaptic protein networks. *J Cell Sci* 116(Pt 15):3213-3219.
- Chuang JZ, Yeh TY, Bollati F, Conde C, Canavosio F, Caceres A, Sung CH. 2005. The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Developmental cell* 9(1):75-86.
- Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. 2007. The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 13(1):36.
- Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC. 1996. MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *Journal of neurochemistry* 66(3):1273-1281.
- Clement MJ, Jourdain I, Lachkar S, Savarin P, Gigant B, Knossow M, Toma F, Sobel A, Curmi PA. 2005. N-terminal stathmin-like peptides bind tubulin and impede microtubule assembly. *Biochemistry* 44(44):14616-14625.
- Cleveland DW, Hughes SH, Stubblefield E, Kirschner MW, Varmus HE. 1981. Multiple α and β tubulin genes represent unlinked and dispersed gene families. *The Journal of biological chemistry* 256(6):3130-3134.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. 1977. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116(2):207-225.
- Corbo JC, Deuel TA, Long JM, LaPorte P, Tsai E, Wynshaw-Boris A, Walsh CA. 2002. Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J Neurosci* 22(17):7548-7557.
- Craig AM, Banker G. 1994. Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17:267-310.
- Craven SE, El-Husseini AE, Brecht DS. 1999. Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron* 22(3):497-509.
- Curmi PA, Andersen SS, Lachkar S, Gavet O, Karsenti E, Knossow M, Sobel A. 1997. The stathmin/tubulin interaction in vitro. *The Journal of biological chemistry* 272(40):25029-25036.
- Curmi PA, Gavet O, Charbaut E, Ozon S, Lachkar-Colmerauer S, Manceau V, Siavoshian S, Maucuer A, Sobel A. 1999. Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell Struct Funct* 24(5):345-357.

D

- Das AK, Dasgupta B, Bhattacharya R, Basu J. 1997. Purification and biochemical characterization of a protein-palmitoyl acyltransferase from human erythrocytes. *The Journal of biological chemistry* 272(17):11021-11025.
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP. 2001. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114(Pt 6):1179-1187.
- De Zeeuw CI, Hoogenraad CC, Goedknecht E, Hertzberg E, Neubauer A, Grosveld F, Galjart N. 1997. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron* 19(6):1187-1199.
- Dehmelt L, Halpain S. 2004. Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol* 58(1):18-33.

- Dehmelt L, Halpain S. 2005. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6(1):204.
- Dehmelt L, Nalbant P, Steffen W, Halpain S. 2006. A microtubule-based, dynein-dependent force induces local cell protrusions: Implications for neurite initiation. *Brain cell biology* 35(1):39-56.
- Dehmelt L, Smart FM, Ozer RS, Halpain S. 2003. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci* 23(29):9479-9490.
- Delmas P, Wanaverbecq N, Abogadie FC, Mistry M, Brown DA. 2002. Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron* 34(2):209-220.
- Denarier E, Aguezzoul M, Jolly C, Vourc'h C, Roure A, Andrieux A, Bosc C, Job D. 1998a. Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6). *Biochem Biophys Res Commun* 243(3):791-796.
- Denarier E, Fourest-Lieuvin A, Bosc C, Pirollet F, Chapel A, Margolis RL, Job D. 1998b. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11):6055-6060.
- Dent EW, Callaway JL, Szebenyi G, Baas PW, Kalil K. 1999. Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. *J Neurosci* 19(20):8894-8908.
- Dent EW, Gertler FB. 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40(2):209-227.
- Dent EW, Kalil K. 2001. Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J Neurosci* 21(24):9757-9769.
- Dent EW, Tang F, Kalil K. 2003. Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist* 9(5):343-353.
- des Portes V, Francis F, Pinard JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoeck I, Meiners LC, Capron F, Cusmai R, Ricci S, Motte J, Echenne B, Ponsot G, Dulac O, Chelly J, Beldjord C. 1998. doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet* 7(7):1063-1070.
- Desai A, Mitchison TJ. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:83-117.
- Di Paolo G, Lutjens R, Pellier V, Stimpson SA, Beuchat MH, Catsicas S, Grenningloh G. 1997. Targeting of SCG10 to the area of the Golgi complex is mediated by its NH2-terminal region. *The Journal of biological chemistry* 272(8):5175-5182.
- Diamantopoulos GS, Perez F, Goodson HV, Batelier G, Melki R, Kreis TE, Rickard JE. 1999. Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *The Journal of cell biology* 144(1):99-112.
- DiBella LM, Benashski SE, Tedford HW, Harrison A, Patel-King RS, King SM. 2001. The Tctex1/Tctex2 class of dynein light chains. Dimerization, differential expression, and interaction with the LC8 protein family. *The Journal of biological chemistry* 276(17):14366-14373.
- Diez-Guerra FJ, Avila J. 1995. An increase in phosphorylation of microtubule-associated protein 2 accompanies dendrite extension during the differentiation of cultured hippocampal neurones. *European journal of biochemistry / FEBS* 227(1-2):68-77.
- Dillon C, Goda Y. 2005. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 28:25-55.
- DiTella MC, Feiguin F, Carri N, Kosik KS, Caceres A. 1996. MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* 109 (Pt 2):467-477.
- Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL. 2008. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science (New York, NY)* 319(5866):1086-1089.
- Doll T, Meichsner M, Riederer BM, Honegger P, Matus A. 1993. An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J Cell Sci* 106 (Pt 2):633-639.

- Dotti CG, Banker GA, Binder LI. 1987. The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23(1):121-130.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8(4):1454-1468.
- Dragestein KA, van Cappellen WA, van Haren J, Tsibidis GD, Akhmanova A, Knoch TA, Grosveld F, Galjart N. 2008. Dynamic behavior of GFP-CLIP-170 reveals fast protein turnover on microtubule plus ends. *The Journal of cell biology* 180(4):729-737.
- Drubin DG, Kirschner MW. 1986. Tau protein function in living cells. *The Journal of cell biology* 103(6 Pt 2):2739-2746.
- Duncan JA, Gilman AG. 1996. Autoacylation of G protein alpha subunits. *The Journal of biological chemistry* 271(38):23594-23600.
- Dunphy JT, Linder ME. 1998. Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta* 1436(1-2):245-261.
- Dustin P. 1980. Microtubules. *Scientific American* 243(2):66-76.
- Dutcher SK. 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol* 13(1):49-54.

E

- Eastwood SL, Lyon L, George L, Andrieux A, Job D, Harrison PJ. 2006. Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice. *J Psychopharmacol*.
- Eastwood SL, Lyon L, George L, Andrieux A, Job D, Harrison PJ. 2007. Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice. *J Psychopharmacol* 21(6):635-644.
- Eberwine J, Miyashiro K, Kacharmina JE, Job C. 2001. Local translation of classes of mRNAs that are targeted to neuronal dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(13):7080-7085.
- Edde B, Rossier J, Le Caer JP, Desbruyeres E, Gros F, Denoulet P. 1990. Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science (New York, NY)* 247(4938):83-85.
- Edelmann W, Zervas M, Costello P, Roback L, Fischer I, Hammarback JA, Cowan N, Davies P, Wainer B, Kucherlapati R. 1996. Neuronal abnormalities in microtubule-associated protein 1B mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(3):1270-1275.
- Efimov A, Kharitonov A, Efimova N, Loncarek J, Miller PM, Andreyeva N, Gleeson P, Galjart N, Maia AR, McLeod IX, Yates JR, 3rd, Maiato H, Khodjakov A, Akhmanova A, Kaverina I. 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Developmental cell* 12(6):917-930.
- Ehlers MD. 2007. Secrets of the secretory pathway in dendrite growth. *Neuron* 55(5):686-689.
- Eipper BA. 1972. Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(8):2283-2287.
- El-Husseini AE, Craven SE, Chetkovich DM, Firestein BL, Schnell E, Aoki C, Brecht DS. 2000. Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering. *The Journal of cell biology* 148(1):159-172.
- el-Husseini Ael D, Brecht DS. 2002. Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. *Nat Rev Neurosci* 3(10):791-802.
- El-Husseini Ael D, Schnell E, Dakoji S, Sweeney N, Zhou Q, Prange O, Gauthier-Campbell C, Aguilera-Moreno A, Nicoll RA, Brecht DS. 2002. Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* 108(6):849-863.
- Elias GM, Funke L, Stein V, Grant SG, Brecht DS, Nicoll RA. 2006. Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron* 52(2):307-320.
- Eng H, Lund K, Campenot RB. 1999. Synthesis of beta-tubulin, actin, and other proteins in axons of sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Neurosciences* 19:1-9.
- Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, Schweitzer A, Saoudi Y, Pointu H, Bosc C, Salin PA, Job D, Wehland J. 2005. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal

organization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

Erickson HP, O'Brien ET. 1992. Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. Annual review of biophysics and biomolecular structure 21:145-166.

Eyer J, Peterson A. 1994. Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. Neuron 12(2):389-405.

F

Fang C, Deng L, Keller CA, Fukata M, Fukata Y, Chen G, Luscher B. 2006. GODZ-mediated palmitoylation of GABA(A) receptors is required for normal assembly and function of GABAergic inhibitory synapses. J Neurosci 26(49):12758-12768.

Farah CA, Perreault S, Liazoghli D, Desjardins M, Anton A, Lauzon M, Paiement J, Leclerc N. 2006. Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. Cell motility and the cytoskeleton 63(11):710-724.

Faulkner NE, Dujardin DL, Tai CY, Vaughan KT, O'Connell CB, Wang Y, Vallee RB. 2000. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. Nature cell biology 2(11):784-791.

Fdez E, Hilfiker S. 2006. Vesicle pools and synapsins: new insights into old enigmas. Brain cell biology 35(2-3):107-115.

Ferguson MA. 1999. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. J Cell Sci 112 (Pt 17):2799-2809.

Ferhat L, Represa A, Bernard A, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M. 1996. MAP2d promotes bundling and stabilization of both microtubules and microfilaments. J Cell Sci 109 (Pt 5):1095-1103.

Fernandez-Hernando C, Fukata M, Bernatchez PN, Fukata Y, Lin MI, Bredt DS, Sessa WC. 2006. Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. The Journal of cell biology 174(3):369-377.

Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. Neuron 20(5):847-854.

Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. Nature neuroscience 3(9):887-894.

Flyvbjerg H, Jobs E, Leibler S. 1996. Kinetics of self-assembling microtubules: an "inverse problem" in biochemistry. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(12):5975-5979.

Folker ES, Baker BM, Goodson HV. 2005. Interactions between CLIP-170, tubulin, and microtubules: implications for the mechanism of Clip-170 plus-end tracking behavior. Molecular biology of the cell 16(11):5373-5384.

Fourest-Lieuvin A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, Lantéz V, Job D. 2006. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. Molecular biology of the cell 17(3):1041-1050.

Fradley RL, O'Meara G F, Newman RJ, Andrieux A, Job D, Reynolds DS. 2005. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. Behav Brain Res 163(2):257-264.

Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J. 1999. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. Neuron 23(2):247-256.

Franco L, Zocchi E, Calder L, Guida L, Benatti U, De Flora A. 1994. Self-aggregation of the transmembrane glycoprotein CD38 purified from human erythrocytes. Biochem Biophys Res Commun 202(3):1710-1715.

Frankle WG, Lerma J, Laruelle M. 2003. The synaptic hypothesis of schizophrenia. Neuron 39(2):205-216.

Friocourt G, Chafey P, Billuart P, Koulakoff A, Vinet MC, Schaar BT, McConnell SK, Francis F, Chelly J. 2001. Doublecortin interacts with mu subunits of clathrin adaptor complexes in the developing nervous system. Mol Cell Neurosci 18(3):307-319.

- Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, Francis F. 2003. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex* 13(6):620-626.
- Fujiwara T, Tanaka K, Inoue E, Kikyo M, Takai Y. 1999. Bni1p regulates microtubule-dependent nuclear migration through the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19(12):8016-8027.
- Fukata M, Fukata Y, Adesnik H, Nicoll RA, Brecht DS. 2004. Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron* 44(6):987-996.
- Fukata M, Watanabe T, Noritake J, Nakagawa M, Yamaga M, Kuroda S, Matsuura Y, Iwamatsu A, Perez F, Kaibuchi K. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 109(7):873-885.
- Fukata Y, Iwanaga T, Fukata M. 2006. Systematic screening for palmitoyl transferase activity of the DHHC protein family in mammalian cells. *Methods* 40(2):177-182.
- Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K. 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38(3):447-460.

G

- Galiano MR, Bosc C, Schweitzer A, Andrieux A, Job D, Hallak ME. 2004. Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms. *J Neurosci Res* 78(3):329-337.
- Garcia ML, Lobsiger CS, Shah SB, Deerinck TJ, Crum J, Young D, Ward CM, Crawford TO, Gotow T, Uchiyama Y, Ellisman MH, Calcutt NA, Cleveland DW. 2003. NF-M is an essential target for the myelin-directed "outside-in" signaling cascade that mediates radial axonal growth. *The Journal of cell biology* 163(5):1011-1020.
- Gard DL, Kirschner MW. 1985. A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *The Journal of cell biology* 100(3):764-774.
- Garner CC, Garner A, Huber G, Kozak C, Matus A. 1990. Molecular cloning of microtubule-associated protein 1 (MAP1A) and microtubule-associated protein 5 (MAP1B): identification of distinct genes and their differential expression in developing brain. *Journal of neurochemistry* 55(1):146-154.
- Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED. 2000. Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr Opin Neurobiol* 10(3):321-327.
- Garner CC, Matus A. 1988. Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *The Journal of cell biology* 106(3):779-783.
- Gauthier-Campbell C, Brecht DS, Murphy TH, El-Husseini Ael D. 2004. Regulation of dendritic branching and filopodia formation in hippocampal neurons by specific acylated protein motifs. *Molecular biology of the cell* 15(5):2205-2217.
- Gavet O, Ozon S, Manceau V, Lawler S, Curmi P, Sobel A. 1998. The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *J Cell Sci* 111 (Pt 22):3333-3346.
- Gigant B, Martin-Barbey C, Curmi PA, Sobel A, Knossow M. 2003. [The stathmin-tubulin interaction and the regulation of the microtubule assembly]. *Pathol Biol (Paris)* 51(1):33-38.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. 1999. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23(2):257-271.
- Gonzalez-Billault C, Demandt E, Wandosell F, Torres M, Bonaldo P, Stoykova A, Chowdhury K, Gruss P, Avila J, Sanchez MP. 2000. Perinatal lethality of microtubule-associated protein 1B-deficient mice expressing alternative isoforms of the protein at low levels. *Mol Cell Neurosci* 16(4):408-421.
- Goold RG, Owen R, Gordon-Weeks PR. 1999. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci* 112 (Pt 19):3373-3384.
- Gordon-Weeks PR. 2004. Microtubules and growth cone function. *J Neurobiol* 58(1):70-83.

- Gory-Faure S, Windscheid V, Bosc C, Peris L, Proietto D, Franck R, Denarier E, Job D, Andrieux A. 2006. STOP-like protein 21 is a novel member of the STOP family, revealing a Golgi localization of STOP proteins. *The Journal of biological chemistry* 281(38):28387-28396.
- Greaves J, Chamberlain LH. 2007. Palmitoylation-dependent protein sorting. *The Journal of cell biology* 176(3):249-254.
- Greengard P, Benfenati F, Valtorta F. 1994. Synapsin I, an actin-binding protein regulating synaptic vesicle traffic in the nerve terminal. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 29:31-45.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(13):4913-4917.
- Grzywa EL, Lee AC, Lee GU, Suter DM. 2006. High-resolution analysis of neuronal growth cone morphology by comparative atomic force and optical microscopy. *J Neurobiol* 66(14):1529-1543.
- Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Denarier E, Pirollet F, Lafanechere L, Job D. 1998. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *The Journal of cell biology* 142(1):167-179.
- Gundersen GG, Kalnoski MH, Bulinski JC. 1984. Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 38(3):779-789.
- Guzik BW, Goldstein LS. 2004. Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction. *Curr Opin Cell Biol* 16(4):443-450.

H

- Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM. 2003. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science (New York, NY)* 300(5620):808-812.
- Halpain S, Dehmelt L. 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7(6):224.
- Halpain S, Hipolito A, Saffer L. 1998. Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J Neurosci* 18(23):9835-9844.
- Halpain S, Spencer K, Graber S. 2005. Dynamics and pathology of dendritic spines. *Prog Brain Res* 147:29-37.
- Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 20(1):71-76.
- Hannah MJ, Schmidt AA, Huttner WB. 1999. Synaptic vesicle biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:733-798.
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N. 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369(6480):488-491.
- Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N. 2002. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *The Journal of cell biology* 158(3):541-549.
- Hardt IH, Steinmetz H, Gerth K, Sasse F, Reichenbach H, Hofle G. 2001. New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains So ce90/B2 and So ce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J Nat Prod* 64(7):847-856.
- Harrison BC, Marchese-Ragona SP, Gilbert SP, Cheng N, Steven AC, Johnson KA. 1993. Decoration of the microtubule surface by one kinesin head per tubulin heterodimer. *Nature* 362(6415):73-75.
- Harrison PJ, Weinberger DR. 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10(8):804.

- Hayashi K, Pan Y, Shu H, Ohshima T, Kansy JW, White CL, 3rd, Tamminga CA, Sobel A, Curmi PA, Mikoshiba K, Bibb JA. 2006. Phosphorylation of the tubulin-binding protein, stathmin, by Cdk5 and MAP kinases in the brain. *Journal of neurochemistry* 99(1):237-250.
- Hayashi T, Rumbaugh G, Huganir RL. 2005. Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron* 47(5):709-723.
- Hayashi T, Soulie F, Nakata T, Hirokawa N. 1994. Redistribution of synapsin I and synaptophysin in response to electrical stimulation in the rat neurohypophyseal nerve endings. *Cell Struct Funct* 19(4):253-262.
- Heald R, Nogales E. 2002. Microtubule dynamics. *J Cell Sci* 115(Pt 1):3-4.
- Heidemann SR, Lamoureux P, Buxbaum RE. 1990. Growth cone behavior and production of traction force. *The Journal of cell biology* 111(5 Pt 1):1949-1957.
- Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P. 1999. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 354(1381):269-279.
- Himmeler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. 1989. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9(4):1381-1388.
- Hirokawa N. 1994. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6(1):74-81.
- Hirokawa N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science (New York, NY)* 279(5350):519-526.
- Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Kobayashi N, Pfister KK, Bloom GS, Brady ST. 1991. Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *The Journal of cell biology* 114(2):295-302.
- Hofle G, Reichenbach H. 2005. Epothilone, a Myxobacterial metabolite with promising antitumor activity. CRC Press ed. Boca Raton, FL. p 413-449.
- Homma N, Takei Y, Tanaka Y, Nakata T, Terada S, Kikkawa M, Noda Y, Hirokawa N. 2003. Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell* 114(2):229-239.
- Honnappa S, Okhrimenko O, Jaussi R, Jawhari H, Jelesarov I, Winkler FK, Steinmetz MO. 2006. Key interaction modes of dynamic +TIP networks. *Molecular cell* 23(5):663-671.
- Hoogenraad CC, Akhmanova A, Galjart N, De Zeeuw CI. 2004. LIMK1 and CLIP-115: linking cytoskeletal defects to Williams syndrome. *Bioessays* 26(2):141-150.
- Hoogenraad CC, Akhmanova A, Grosveld F, De Zeeuw CI, Galjart N. 2000. Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J Cell Sci* 113 (Pt 12):2285-2297.
- Hoogenraad CC, Eussen BH, Langeveld A, van Haperen R, Winterberg S, Wouters CH, Grosveld F, De Zeeuw CI, Galjart N. 1998. The murine CYLN2 gene: genomic organization, chromosome localization, and comparison to the human gene that is located within the 7q11.23 Williams syndrome critical region. *Genomics* 53(3):348-358.
- Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, Chelly J, Reiner O. 1999. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* 8(9):1599-1610.
- Horton AC, Ehlers MD. 2003a. Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *J Neurosci* 23(15):6188-6199.
- Horton AC, Ehlers MD. 2003b. Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40(2):277-295.
- Horton AC, Ehlers MD. 2004. Secretory trafficking in neuronal dendrites. *Nature cell biology* 6(7):585-591.
- Horton AC, Racz B, Monson EE, Lin AL, Weinberg RJ, Ehlers MD. 2005. Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron* 48(5):757-771.
- Howell B, Deacon H, Cassimeris L. 1999a. Decreasing oncoprotein 18/stathmin levels reduces microtubule catastrophes and increases microtubule polymer in vivo. *J Cell Sci* 112 (Pt 21):3713-3722.
- Howell B, Larsson N, Gullberg M, Cassimeris L. 1999b. Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Molecular biology of the cell* 10(1):105-118.

- Huang K, El-Husseini A. 2005. Modulation of neuronal protein trafficking and function by palmitoylation. *Curr Opin Neurobiol* 15(5):527-535.
- Huang K, Yanai A, Kang R, Arstikaitis P, Singaraja RR, Metzler M, Mullard A, Haigh B, Gauthier-Campbell C, Gutekunst CA, Hayden MR, El-Husseini A. 2004. Huntingtin-interacting protein HIP14 is a palmitoyl transferase involved in palmitoylation and trafficking of multiple neuronal proteins. *Neuron* 44(6):977-986.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417(6887):455-458.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF. 2000. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science (New York, NY)* 288(5469):1254-1257.
- Hurley JH, Cahill AL, Currie KP, Fox AP. 2000. The role of dynamic palmitoylation in Ca²⁺ channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16):9293-9298.

J

- Janke C, Rogowski K, Wloga D, Regnard C, Kajava AV, Strub JM, Temurak N, van Dijk J, Boucher D, van Dorsselaer A, Suryavanshi S, Gaertig J, Edde B. 2005. Tubulin Polyglutamylase Enzymes Are Members of the TTL Domain Protein Family. *Science (New York, NY)*.
- Job C, Eberwine J. 2001. Identification of sites for exponential translation in living dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(23):13037-13042.
- Job D, Fischer EH, Margolis RL. 1981. Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(8):4679-4682.
- Job D, Margolis RL. 1984. Isolation from bovine brain of a superstable microtubule subpopulation with microtubule seeding activity. *Biochemistry* 23(13):3025-3031.
- Job D, Pabion M, Margolis RL. 1985. Generation of microtubule stability subclasses by microtubule-associated proteins: implications for the microtubule "dynamic instability" model. *The Journal of cell biology* 101(5 Pt 1):1680-1689.
- Job D, Rauch CT, Fischer EH, Margolis RL. 1982. Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry* 21(3):509-515.
- Job D, Rauch CT, Fischer EH, Margolis RL. 1983. Regulation of microtubule cold stability by calmodulin-dependent and -independent phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(13):3894-3898.
- Job D, Rauch CT, Margolis RL. 1987. High concentrations of STOP protein induce a microtubule super-stable state. *Biochem Biophys Res Commun* 148(1):429-434.
- Job D, Valiron O, Oakley B. 2003. Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol* 15(1):111-117.
- Jordan MA, Wilson L. 1998. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* 10(1):123-130.
- Jourdain I, Lachkar S, Charbaut E, Gigant B, Knossow M, Sobel A, Curmi PA. 2004. A synergistic relationship between three regions of stathmin family proteins is required for the formation of a stable complex with tubulin. *Biochem J* 378(Pt 3):877-888.
- Jourdain L, Curmi P, Sobel A, Pantaloni D, Carlier MF. 1997. Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules. *Biochemistry* 36(36):10817-10821.

K

- Kaech S, Parmar H, Roelandse M, Bornmann C, Matus A. 2001. Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(13):7086-7092.
- Kalil K, Dent EW. 2005. Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Curr Opin Neurobiol* 15(5):521-526.
- Kalil K, Szebenyi G, Dent EW. 2000. Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching. *J Neurobiol* 44(2):145-158.

- Kamiya A, Kubo KI, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, Sawamura N, Park U, Kudo C, Okawa M, Ross CA, Hatten ME, Nakajima K, Sawa A. 2005. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nature cell biology* 7(12):1067-1078.
- Kanaani J, el-Husseini Ael D, Aguilera-Moreno A, Diacovo JM, Brecht DS, Baekkeskov S. 2002. A combination of three distinct trafficking signals mediates axonal targeting and presynaptic clustering of GAD65. *The Journal of cell biology* 158(7):1229-1238.
- Kang R, Swayze R, Lise MF, Gerrow K, Mullard A, Honer WG, El-Husseini A. 2004. Presynaptic trafficking of synaptotagmin I is regulated by protein palmitoylation. *The Journal of biological chemistry* 279(48):50524-50536.
- Kappeler C, Saillour Y, Baudoin JP, Tuy FP, Alvarez C, Houbbron C, Gaspar P, Hamard G, Chelly J, Metin C, Francis F. 2006. Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum Mol Genet* 15(9):1387-1400.
- Keller CA, Yuan X, Panzanelli P, Martin ML, Alldred M, Sassoe-Pognetto M, Luscher B. 2004. The gamma2 subunit of GABA(A) receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *J Neurosci* 24(26):5881-5891.
- Kennedy MB. 1993. The postsynaptic density. *Curr Opin Neurobiol* 3(5):732-737.
- Kerjan G, Gleeson JG. 2007. Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly. *Trends Genet* 23(12):623-630.
- Khaitlina SY. 2001. Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol* 202:35-98.
- Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC. 1988. Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *The Journal of cell biology* 106(1):141-149.
- Kikkawa M, Ishikawa T, Nakata T, Wakabayashi T, Hirokawa N. 1994. Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *The Journal of cell biology* 127(6 Pt 2):1965-1971.
- Kinzler KW, Vogelstein B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87(2):159-170.
- Kittur S, Hoh J, Endo H, Tourtellotte W, Weeks BS, Markesbery W, Adler W. 1994. Cytoskeletal neurofilament gene expression in brain tissue from Alzheimer's disease patients. I. Decrease in NF-L and NF-M message. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7(3):153-158.
- Komarova Y, Lansbergen G, Galjart N, Grosveld F, Borisy GG, Akhmanova A. 2005. EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Molecular biology of the cell* 16(11):5334-5345.
- Komarova YA, Akhmanova AS, Kojima S, Galjart N, Borisy GG. 2002. Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *The Journal of cell biology* 159(4):589-599.
- Kopeck C, Malinow R. 2006. Neuroscience. Matters of size. *Science (New York, NY)* 314(5805):1554-1555.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science (New York, NY)* 269(5231):1737-1740.
- Kortazar D, Carranza G, Bellido J, Villegas JC, Fanarraga ML, Zabala JC. 2006. Native tubulin-folding cofactor E purified from baculovirus-infected Sf9 cells dissociates tubulin dimers. *Protein Expr Purif* 49(2):196-202.
- Kosco KA, Pearson CG, Maddox PS, Wang PJ, Adams IR, Salmon ED, Bloom K, Huffaker TC. 2001. Control of microtubule dynamics by Stu2p is essential for spindle orientation and metaphase chromosome alignment in yeast. *Molecular biology of the cell* 12(9):2870-2880.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2(4):1389-1397.
- Kreis TE. 1987. Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *Embo J* 6(9):2597-2606.
- Kriz J, Zhu Q, Julien JP, Padjen AL. 2000. Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain Res* 885(1):32-44.
- Krucker T, Siggins GR, Halpain S. 2000. Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(12):6856-6861.

Kuriu T, Inoue A, Bito H, Sobue K, Okabe S. 2006. Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *J Neurosci* 26(29):7693-7706.

L

Lafanechere L, Courtay-Cahen C, Kawakami T, Jacrot M, Rudiger M, Wehland J, Job D, Margolis RL. 1998. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci* 111 (Pt 2):171-181.

Lafanechere L, Job D. 2000. The third tubulin pool. *Neurochem Res* 25(1):11-18.

Lai M, Wang F, Rohan JG, Maeno-Hikichi Y, Chen Y, Zhou Y, Gao G, Sather WA, Zhang JF. 2005. A tctex1-Ca²⁺ channel complex for selective surface expression of Ca²⁺ channels in neurons. *Nature neuroscience* 8(4):435-442.

Lallemant-Breitenbach V, Quesnoit M, Braun V, El Marjou A, Pous C, Goud B, Perez F. 2004. CLIPR-59 is a lipid raft-associated protein containing a cytoskeleton-associated protein glycine-rich domain (CAP-Gly) that perturbs microtubule dynamics. *The Journal of biological chemistry* 279(39):41168-41178.

Landis DM, Reese TS. 1983. Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *The Journal of cell biology* 97(4):1169-1178.

Lane SR, Liu Y. 1997. Characterization of the palmitoylation domain of SNAP-25. *Journal of neurochemistry* 69(5):1864-1869.

Langkopf A, Hammarback JA, Muller R, Vallee RB, Garner CC. 1992. Microtubule-associated proteins 1A and LC2. Two proteins encoded in one messenger RNA. *The Journal of biological chemistry* 267(23):16561-16566.

Lansbergen G, Akhmanova A. 2006. Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7(5):499-507.

Lansbergen G, Komarova Y, Modesti M, Wyman C, Hoogenraad CC, Goodson HV, Lemaitre RP, Drechsel DN, van Munster E, Gadella TW, Jr., Grosveld F, Galjart N, Borisy GG, Akhmanova A. 2004. Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization. *The Journal of cell biology* 166(7):1003-1014.

Larsson N, Segerman B, Gradin HM, Wandzioch E, Cassimeris L, Gullberg M. 1999a. Mutations of oncoprotein 18/stathmin identify tubulin-directed regulatory activities distinct from tubulin association. *Mol Cell Biol* 19(3):2242-2250.

Larsson N, Segerman B, Howell B, Fridell K, Cassimeris L, Gullberg M. 1999b. Op18/stathmin mediates multiple region-specific tubulin and microtubule-regulating activities. *The Journal of cell biology* 146(6):1289-1302.

Lasek RJ. 1986. Polymer sliding in axons. *Journal of cell science* 5:161-179.

Lawler S, Gavet O, Rich T, Sobel A. 1998. Stathmin overexpression in 293 cells affects signal transduction and cell growth. *FEBS Lett* 421(1):55-60.

Ledesma MD, Da Silva JS, Schevchenko A, Wilm M, Dotti CG. 2003. Proteomic characterisation of neuronal sphingolipid-cholesterol microdomains: role in plasminogen activation. *Brain research* 987(1):107-116.

Lee H, Engel U, Rusch J, Scherrer S, Sheard K, Van Vactor D. 2004. The microtubule plus end tracking protein Orbit/MAST/CLASP acts downstream of the tyrosine kinase Abl in mediating axon guidance. *Neuron* 42(6):913-926.

Lee MK, Cleveland DW. 1996. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19:187-217.

Lee MK, Xu Z, Wong PC, Cleveland DW. 1993. Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *The Journal of cell biology* 122(6):1337-1350.

Lewis SA, Wang DH, Cowan NJ. 1988. Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science (New York, NY)* 242(4880):936-939.

Lichtner RB, Rotgeri A, Bunte T, Buchmann B, Hoffmann J, Schwede W, Skuballa W, Klar U. 2001. Subcellular distribution of epothilones in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20):11743-11748.

Liedtke W, Leman EE, Fyffe RE, Raine CS, Schubart UK. 2002. Stathmin-deficient mice develop an age-dependent axonopathy of the central and peripheral nervous systems. *Am J Pathol* 160(2):469-480.

- Lim SS, Sammak PJ, Borisy GG. 1989. Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells. *The Journal of cell biology* 109(1):253-263.
- Lin RC, Scheller RH. 2000. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annual review of cell and developmental biology* 16:19-49.
- Linder ME, Deschenes RJ. 2003. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 42(15):4311-4320.
- Lisman J. 2003. Actin's actions in LTP-induced synapse growth. *Neuron* 38(3):361-362.
- Liu Y, Fisher DA, Storm DR. 1993. Analysis of the palmitoylation and membrane targeting domain of neuromodulin (GAP-43) by site-specific mutagenesis. *Biochemistry* 32(40):10714-10719.
- Lopez-Fanarraga M, Carranza G, Bellido J, Kortazar D, Villegas JC, Zabala JC. 2007. Tubulin cofactor B plays a role in the neuronal growth cone. *Journal of neurochemistry* 100(6):1680-1687.
- Lowe J, Amos LA. 2000. Helical tubes of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *Biol Chem* 381(9-10):993-999.
- Lowe J, Li H, Downing KH, Nogales E. 2001. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* 313(5):1045-1057.
- Lu M, Kosik KS. 2001. Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Molecular biology of the cell* 12(1):171-184.
- Luscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D. 2000. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nature neuroscience* 3(6):545-550.
- Lutjens R, Igarashi M, Pellier V, Blasey H, Di Paolo G, Ruchti E, Pfulg C, Staple JK, Catsicas S, Grenningloh G. 2000. Localization and targeting of SCG10 to the trans-Golgi apparatus and growth cone vesicles. *Eur J Neurosci* 12(7):2224-2234.

M

- MacRae TH. 1997. Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *European journal of biochemistry / FEBS* 244(2):265-278.
- Mandelkow E, Schultheiss R, Mandelkow EM. 1984a. Assembly and three-dimensional image reconstruction of tubulin hoops. *J Mol Biol* 177(3):507-529.
- Mandelkow E, Schultheiss R, Mandelkow EM. 1984b. Reconstructions of tubulin protofilaments: different appearances of the same structure. *Ultramicroscopy* 13(1-2):125-136.
- Mandelkow EM, Lange G, Jagla A, Spann U, Mandelkow E. 1988. Dynamics of the microtubule oscillator: role of nucleotides and tubulin-MAP interactions. *Embo J* 7(2):357-365.
- Mandell JW, Banker GA. 1995. The microtubule cytoskeleton and the development of neuronal polarity. *Neurobiol Aging* 16(3):229-237; discussion 238.
- Mandell JW, Banker GA. 1996. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 16(18):5727-5740.
- Manna T, Thrower D, Miller HP, Curmi P, Wilson L. 2006. Stathmin strongly increases the minus end catastrophe frequency and induces rapid treadmilling of bovine brain microtubules at steady state in vitro. *The Journal of biological chemistry* 281(4):2071-2078.
- Margolis RL. 1981. Role of GTP hydrolysis in microtubule treadmilling and assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(3):1586-1590.
- Margolis RL, Job D. 1984. Control of microtubule stability by calmodulin-dependent and -independent phosphorylation. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 17:417-425.
- Margolis RL, Rauch CT. 1981. Characterization of rat brain crude extract microtubule assembly: correlation of cold stability with the phosphorylation state of a microtubule-associated 64K protein. *Biochemistry* 20(15):4451-4458.
- Margolis RL, Rauch CT, Job D. 1986. Purification and assay of a 145-kDa protein (STOP145) with microtubule-stabilizing and motility behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(3):639-643.
- Margolis RL, Rauch CT, Pirollet F, Job D. 1990. Specific association of STOP protein with microtubules in vitro and with stable microtubules in mitotic spindles of cultured cells. *Embo J* 9(12):4095-4502.

- Margolis RL, Wilson L. 1978. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell* 13(1):1-8.
- Margolis RL, Wilson L. 1981. Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature* 293(5835):705-711.
- Matsuzaki S, Tohyama M. 2007. Molecular mechanism of schizophrenia with reference to disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1). *Neurochem Int* 51(2-4):165-172.
- Matus A. 1990. Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol (Paris)* 84(1):134-137.
- Matus A. 1999. Postsynaptic actin and neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 9(5):561-565.
- Matus A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science (New York, NY)* 290(5492):754-758.
- Matus A. 2005. Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr Opin Neurobiol* 15(1):67-72.
- Meichsner M, Doll T, Reddy D, Weisshaar B, Matus A. 1993. The low molecular weight form of microtubule-associated protein 2 is transported into both axons and dendrites. *Neuroscience* 54(4):873-880.
- Mialhe A, Lafanechere L, Treilleux I, Peloux N, Dumontet C, Bremond A, Panh MH, Payan R, Wehland J, Margolis RL, Job D. 2001. Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer research* 61(13):5024-5027.
- Miki H, Okada Y, Hirokawa N. 2005. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends in cell biology* 15(9):467-476.
- Miller RK, Heller KK, Frisen L, Wallack DL, Loayza D, Gammie AE, Rose MD. 1998. The kinesin-related proteins, Kip2p and Kip3p, function differently in nuclear migration in yeast. *Molecular biology of the cell* 9(8):2051-2068.
- Mitchell DA, Vasudevan A, Linder ME, Deschenes RJ. 2006. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *Journal of lipid research* 47(6):1118-1127.
- Mitchison T, Kirschner M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312(5991):237-242.
- Mitchison T, Kirschner M. 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1(9):761-772.
- Mitchison TJ. 1989. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *The Journal of cell biology* 109(2):637-652.
- Mitchison TJ. 1993. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science (New York, NY)* 261(5124):1044-1047.
- Mitsuyama F, Niimi G, Kato K, Hirosawa K, Mikoshiba K, Okuya M, Karagiozov K, Kato Y, Kanno T, Sanoe H, Koide T. 2008. Redistribution of microtubules in dendrites of hippocampal CA1 neurons after tetanic stimulation during long-term potentiation. *Ital J Anat Embryol* 113(1):17-27.
- Mok YK, Lo KW, Zhang M. 2001. Structure of Tctex-1 and its interaction with cytoplasmic dynein intermediate chain. *The Journal of biological chemistry* 276(17):14067-14074.
- Moore CA, Francis F, Perderiset M, Houdusse A. 2003. A double-take on MAPs. *Nat Struct Biol* 10(5):314-316.
- Moore CA, Perderiset M, Francis F, Chelly J, Houdusse A, Milligan RA. 2004. Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Molecular cell* 14(6):833-839.
- Moore CA, Perderiset M, Kappeler C, Kain S, Drummond D, Perkins SJ, Chelly J, Cross R, Houdusse A, Francis F. 2006. Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. *Embo J* 25(19):4448-4457.
- Morii H, Shiraishi-Yamaguchi Y, Mori N. 2006. SCG10, a microtubule destabilizing factor, stimulates the neurite outgrowth by modulating microtubule dynamics in rat hippocampal primary cultured neurons. *J Neurobiol* 66(10):1101-1114.
- Moritz M, Agard DA. 2001. Gamma-tubulin complexes and microtubule nucleation. *Curr Opin Struct Biol* 11(2):174-181.
- Moritz M, Braunfeld MB, Sedat JW, Alberts B, Agard DA. 1995. Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378(6557):638-640.
- Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP. 2003. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet* 12(13):1591-1608.

Morrison EE. 2007. Action and interactions at microtubule ends. *Cell Mol Life Sci* 64(3):307-317.
Mumby SM. 1997. Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9(2):148-154.

N

- Nagano F, Orita S, Sasaki T, Naito A, Sakaguchi G, Maeda M, Watanabe T, Kominami E, Uchiyama Y, Takai Y. 1998. Interaction of Doc2 with tctex-1, a light chain of cytoplasmic dynein. Implication in dynein-dependent vesicle transport. *The Journal of biological chemistry* 273(46):30065-30068.
- Nakagawa H, Koyama K, Murata Y, Morito M, Akiyama T, Nakamura Y. 2000. EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. *Oncogene* 19(2):210-216.
- Nakamura M, Zhou XZ, Lu KP. 2001. Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr Biol* 11(13):1062-1067.
- Nakata T, Hirokawa N. 2003. Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *The Journal of cell biology* 162(6):1045-1055.
- Nettles JH, Li H, Cornett B, Krahn JM, Snyder JP, Downing KH. 2004. The binding mode of epothilone A on alpha,beta-tubulin by electron crystallography. *Science (New York, NY)* 305(5685):866-869.
- Neve RL, Selkoe DJ, Kurnit DM, Kosik KS. 1986. A cDNA for a human microtubule associated protein 2 epitope in the Alzheimer neurofibrillary tangle. *Brain Res* 387(2):193-196.
- Niethammer P, Delling M, Sytnyk V, Dityatev A, Fukami K, Schachner M. 2002. Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *The Journal of cell biology* 157(3):521-532.
- Nixon RA. 1993. The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology. *Brain Pathol* 3(1):29-38.
- Noble M, Lewis SA, Cowan NJ. 1989. The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *The Journal of cell biology* 109(6 Pt 2):3367-3376.
- Nogales E. 1999. A structural view of microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* 56(1-2):133-142.
- Noiges R, Eichinger R, Kutschera W, Fischer I, Nemeth Z, Wiche G, Propst F. 2002. Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J Neurosci* 22(6):2106-2114.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. 2003. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Molecular cell* 11(2):437-444.

O

- Ohara O, Gahara Y, Miyake T, Teraoka H, Kitamura T. 1993. Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *The Journal of cell biology* 121(2):387-395.
- Olmsted JB. 1986. Microtubule-associated proteins. *Annu Rev Cell Biol* 2:421-457.
- Orban-Nemeth Z, Simader H, Badurek S, Trancikova A, Propst F. 2005. Microtubule-associated protein 1S, a short and ubiquitously expressed member of the microtubule-associated protein 1 family. *The Journal of biological chemistry* 280(3):2257-2265.
- Owen MJ, Craddock N, O'Donovan M C. 2005a. Schizophrenia: genes at last? *Trends Genet* 21(9):518-525.
- Owen MJ, O'Donovan MC, Harrison PJ. 2005b. Schizophrenia: a genetic disorder of the synapse? *BMJ* 330(7484):158-159.
- Ozols J, Caron JM. 1997. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation. *Molecular biology of the cell* 8(4):637-645.
- Ozon S, Byk T, Sobel A. 1998. SCLIP: a novel SCG10-like protein of the stathmin family expressed in the nervous system. *Journal of neurochemistry* 70(6):2386-2396.
- Ozon S, Maucuer A, Sobel A. 1997. The stathmin family -- molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system. *European journal of biochemistry / FEBS* 248(3):794-806.

P

- Pak CW, Flynn KC, Bamberg JR. 2008. Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Rev Neurosci* 9(2):136-147.
- Papoulas O, Hays TS, Sisson JC. 2005. The golgin Lava lamp mediates dynein-based Golgi movements during *Drosophila* cellularization. *Nature cell biology* 7(6):612-618.
- Patterson SI, Skene JH. 1994. Novel inhibitory action of tunicamycin homologues suggests a role for dynamic protein fatty acylation in growth cone-mediated neurite extension. *The Journal of cell biology* 124(4):521-536.
- Paturle-Lafanechère L, Eddé B, Denoulet P, Van Dorsselaer A, Mazarguil H, Le Caer JP, Wehland J, Job D. 1991. Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* 30(43):10523-10528.
- Paturle-Lafanechère L, Manier M, Trigault N, Pirollet F, Mazarguil H, Job D. 1994. Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* 107 (Pt 6):1529-1543.
- Peitzsch RM, McLaughlin S. 1993. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 32(39):10436-10443.
- Perez-Olle R, Lopez-Toledano MA, Goryunov D, Cabrera-Poch N, Stefanis L, Brown K, Liem RK. 2005. Mutations in the neurofilament light gene linked to Charcot-Marie-Tooth disease cause defects in transport. *Journal of neurochemistry* 93(4):861-874.
- Perez AS, Brecht DS. 1998. The N-terminal PDZ-containing region of postsynaptic density-95 mediates association with caveolar-like lipid domains. *Neurosci Lett* 258(2):121-123.
- Perez F, Diamantopoulos GS, Stalder R, Kreis TE. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* 96(4):517-527.
- Perez F, Pernet-Gallay K, Nizak C, Goodson HV, Kreis TE, Goud B. 2002. CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family. *The Journal of cell biology* 156(4):631-642.
- Peris L, Thery M, Faure J, Saoudi Y, Lafanechère L, Chilton JK, Gordon-Weeks P, Galjart N, Bornens M, Wordeman L, Wehland J, Andrieux A, Job D. 2006. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *The Journal of cell biology* 174(6):839-849.
- Petzold A. 2005. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 233(1-2):183-198.
- Pierce JP, Mayer T, McCarthy JB. 2001. Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr Biol* 11(5):351-355.
- Pierre P, Scheel J, Rickard JE, Kreis TE. 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* 70(6):887-900.
- Pirollet F, Derancourt J, Haiech J, Job D, Margolis RL. 1992. Ca(2+)-calmodulin regulated effectors of microtubule stability in bovine brain. *Biochemistry* 31(37):8849-8855.
- Pirollet F, Job D, Fischer EH, Margolis RL. 1983. Purification and characterization of sheep brain cold-stable microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(6):1560-1564.
- Pirollet F, Job D, Margolis RL. 1987. Biochemical assay of microtubule mean length. *Anal Biochem* 167(2):352-357.
- Pirollet F, Rauch CT, Job D, Margolis RL. 1989. Monoclonal antibody to microtubule-associated STOP protein: affinity purification of neuronal STOP activity and comparison of antigen with activity in neuronal and nonneuronal cell extracts. *Biochemistry* 28(2):835-842.
- Politis EG, Roth AF, Davis NG. 2005. Transmembrane topology of the protein palmitoyl transferase Akr1. *The Journal of biological chemistry* 280(11):10156-10163.
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29:545-576.
- Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112(4):453-465.

- Poulain FE, Sobel A. 2007. The "SCG10-Like Protein" SCLIP is a novel regulator of axonal branching in hippocampal neurons, unlike SCG10. *Mol Cell Neurosci* 34(2):137-146.
- Prochiantz A, Theodore L. 1995. Nuclear/growth factors. *Bioessays* 17(1):39-44.

Q

- Qin N, Platano D, Olcese R, Costantin JL, Stefani E, Birnbaumer L. 1998. Unique regulatory properties of the type 2a Ca²⁺ channel beta subunit caused by palmitoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(8):4690-4695.

R

- Raab-Graham KF, Haddick PC, Jan YN, Jan LY. 2006. Activity- and mTOR-dependent suppression of Kv1.1 channel mRNA translation in dendrites. *Science (New York, NY)* 314(5796):144-148.
- Rabow LE, Russek SJ, Farb DH. 1995. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. *Synapse (New York, NY)* 21(3):189-274.
- Rathenberg J, Kittler JT, Moss SJ. 2004. Palmitoylation regulates the clustering and cell surface stability of GABAA receptors. *Mol Cell Neurosci* 26(2):251-257.
- Raucher D, Sheetz MP. 2000. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *The Journal of cell biology* 148(1):127-136.
- Ravelli RB, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, Knossow M. 2004. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 428(6979):198-202.
- Redeker V, Lachkar S, Siavoshian S, Charbaut E, Rossier J, Sobel A, Curmi PA. 2000. Probing the native structure of stathmin and its interaction domains with tubulin. Combined use of limited proteolysis, size exclusion chromatography, and mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* 275(10):6841-6849.
- Redeker V, Levilliers N, Schmitter JM, Le Caer JP, Rossier J, Adoutte A, Bre MH. 1994. Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science (New York, NY)* 266(5191):1688-1691.
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16(21):2166-2172.
- Resh MD. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451(1):1-16.
- Richards DA, De Paola V, Caroni P, Gahwiler BH, McKinney RA. 2004. AMPA-receptor activation regulates the diffusion of a membrane marker in parallel with dendritic spine motility in the mouse hippocampus. *J Physiol* 558(Pt 2):503-512.
- Riederer BM, Pellier V, Antonsson B, Di Paolo G, Stimpson SA, Lutjens R, Catsicas S, Grenningloh G. 1997. Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(2):741-745.
- Robert M, Mathuranath PS. 2007. Tau and tauopathies. *Neurol India* 55(1):11-16.
- Robertson J, Loviny TL, Goedert M, Jakes R, Murray KJ, Anderton BH, Hanger DP. 1993. Phosphorylation of tau by cyclic-AMP-dependent protein kinase. *Dementia* 4(5):256-263.
- Rochlin MW, Dailey ME, Bridgman PC. 1999. Polymerizing microtubules activate site-directed F-actin assembly in nerve growth cones. *Molecular biology of the cell* 10(7):2309-2327.
- Rodionov VI, Borisy GG. 1997. Microtubule treadmilling in vivo. *Science (New York, NY)* 275(5297):215-218.
- Roger B, Al-Bassam J, Dehmelt L, Milligan RA, Halpain S. 2004. MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr Biol* 14(5):363-371.
- Ross EM. 1995. Protein modification. Palmitoylation in G-protein signaling pathways. *Curr Biol* 5(2):107-109.
- Roth AF, Wan J, Bailey AO, Sun B, Kuchar JA, Green WN, Phinney BS, Yates JR, 3rd, Davis NG. 2006. Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell* 125(5):1003-1013.

S

- Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61(2):133-168.
- Sankaranarayanan S, Atluri PP, Ryan TA. 2003. Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nature neuroscience* 6(2):127-135.
- Sapir T, Horesh D, Caspi M, Atlas R, Burgess HA, Wolf SG, Francis F, Chelly J, Elbaum M, Pietrokovski S, Reiner O. 2000. Doublecortin mutations cluster in evolutionarily conserved functional domains. *Hum Mol Genet* 9(5):703-712.
- Schaar BT, Kinoshita K, McConnell SK. 2004. Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* 41(2):203-213.
- Schaefer AW, Kabir N, Forscher P. 2002. Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *The Journal of cell biology* 158(1):139-152.
- Scheel J, Pierre P, Rickard JE, Diamantopoulos GS, Valetti C, van der Goot FG, Haner M, Aebi U, Kreis TE. 1999. Purification and analysis of authentic CLIP-170 and recombinant fragments. *The Journal of biological chemistry* 274(36):25883-25891.
- Schober JM, Komarova YA, Chaga OY, Akhmanova A, Borisy GG. 2007. Microtubule-targeting-dependent reorganization of filopodia. *J Cell Sci* 120(Pt 7):1235-1244.
- Schoenfeld TA, McKerracher L, Obar R, Vallee RB. 1989. MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci* 9(5):1712-1730.
- Schubert V, Da Silva JS, Dotti CG. 2006. Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *The Journal of cell biology* 172(3):453-467.
- Seitz-Tutter D, Langford GM, Weiss DG. 1988. Dynamic instability of native microtubules from squid axons is rare and independent of gliding and vesicle transport. *Experimental cell research* 178(2):504-512.
- Sekino Y, Kojima N, Shirao T. 2007. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem Int* 51(2-4):92-104.
- Sharma N, Kress Y, Shafit-Zagardo B. 1994. Antisense MAP-2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neuritic elongation in pre-existing neurites of rat cortical neurons. *Cell motility and the cytoskeleton* 27(3):234-247.
- Shumyatsky GP, Malleret G, Shin RM, Takizawa S, Tully K, Tsvetkov E, Zakharenko SS, Joseph J, Vronskaia S, Yin D, Schubart UK, Kandel ER, Bolshakov VY. 2005. stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear. *Cell* 123(4):697-709.
- Sinensky M. 2000. Recent advances in the study of prenylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1484(2-3):93-106.
- Skene JH. 1989. Axonal growth-associated proteins. *Annual review of neuroscience* 12:127-156.
- Skene JH, Virag I. 1989. Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. *The Journal of cell biology* 108(2):613-624.
- Slaughter T, Black MM. 2003. STOP (stable-tubule-only-polypeptide) is preferentially associated with the stable domain of axonal microtubules. *Journal of neurocytology* 32(4):399-413.
- Slep KC, Rogers SL, Elliott SL, Ohkura H, Kolodziej PA, Vale RD. 2005. Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *The Journal of cell biology* 168(4):587-598.
- Sloboda RD, Dentler WL, Rosenbaum JL. 1976. Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochemistry* 15(20):4497-4505.
- Smotrys JE, Schoenfish MJ, Stutz MA, Linder ME. 2005. The vacuolar DHHC-CRD protein Pfa3p is a protein acyltransferase for Vac8p. *The Journal of cell biology* 170(7):1091-1099.
- Sobel A. 1991. Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem Sci* 16(8):301-305.
- Soderling TR. 2000. CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10(3):375-380.

- Steffen W, Karki S, Vaughan KT, Vallee RB, Holzbaur EL, Weiss DG, Kuznetsov SA. 1997. The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Molecular biology of the cell* 8(10):2077-2088.
- Steinmetz MO. 2007. Structure and thermodynamics of the tubulin-stathmin interaction. *J Struct Biol* 158(2):137-147.
- Steward O, Schuman EM. 2003. Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* 40(2):347-359.
- Stoothoff WH, Johnson GV. 2005. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* 1739(2-3):280-297.
- Strelkov SV, Herrmann H, Aepli U. 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25(3):243-251.
- Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW. 1995. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer research* 55(14):2972-2977.
- Suh J, Wirtz D, Hanes J. 2004. Real-time intracellular transport of gene nanocarriers studied by multiple particle tracking. *Biotechnol Prog* 20(2):598-602.
- Suopanki J, Tyynela J, Baumann M, Haltia M. 1999. Palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in neurodegeneration, is localized in neurons and is developmentally regulated in rat brain. *Neuroscience letters* 265(1):53-56.
- Szebenyi G, Bollati F, Bisbal M, Sheridan S, Faas L, Wray R, Haferkamp S, Nguyen S, Caceres A, Brady ST. 2005. Activity-driven dendritic remodeling requires microtubule-associated protein 1A. *Curr Biol* 15(20):1820-1826.

T

- Tai AW, Chuang JZ, Sung CH. 1998. Localization of Tctex-1, a cytoplasmic dynein light chain, to the Golgi apparatus and evidence for dynein complex heterogeneity. *The Journal of biological chemistry* 273(31):19639-19649.
- Tai CY, Dujardin DL, Faulkner NE, Vallee RB. 2002. Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *The Journal of cell biology* 156(6):959-968.
- Takei Y, Harada A, Takeda S, Kobayashi K, Terada S, Noda T, Takahashi T, Hirokawa N. 1995. Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system. *The Journal of cell biology* 131(6 Pt 2):1789-1800.
- Takei Y, Kondo S, Harada A, Inomata S, Noda T, Hirokawa N. 1997. Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *The Journal of cell biology* 137(7):1615-1626.
- Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N. 2000. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *The Journal of cell biology* 150(5):989-1000.
- Tanaka E, Sabry J. 1995. Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83(2):171-176.
- Tanaka EM, Kirschner MW. 1991. Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *The Journal of cell biology* 115(2):345-363.
- Tang BL, Chua CE. 2008. SIRT2, tubulin deacetylation, and oligodendroglia differentiation. *Cell motility and the cytoskeleton* 65(3):179-182.
- Taniguchi H. 1999. Protein myristoylation in protein-lipid and protein-protein interactions. *Biophys Chem* 82(2-3):129-137.
- Tararuk T, Ostman N, Li W, Bjorkblom B, Padzik A, Zdrojewska J, Hongisto V, Herdegen T, Konopka W, Courtney MJ, Coffey ET. 2006. JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *The Journal of cell biology* 173(2):265-277.
- Taylor KR, Holzer AK, Bazan JF, Walsh CA, Gleeson JG. 2000. Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain. *The Journal of biological chemistry* 275(44):34442-34450.
- Teng J, Takei Y, Harada A, Nakata T, Chen J, Hirokawa N. 2001. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *The Journal of cell biology* 155(1):65-76.
- Thorn KS, Ubersax JA, Vale RD. 2000. Engineering the processive run length of the kinesin motor. *The Journal of cell biology* 151(5):1093-1100.

- Thyberg J, Moskalewski S. 1999. Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Experimental cell research* 246(2):263-279.
- Tian G, Huang Y, Rommelaere H, Vandekerckhove J, Ampe C, Cowan NJ. 1996. Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell* 86(2):287-296.
- Tirnauer JS, Grego S, Salmon ED, Mitchison TJ. 2002. EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Molecular biology of the cell* 13(10):3614-3626.
- Togel M, Wiche G, Propst F. 1998. Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *The Journal of cell biology* 143(3):695-707.
- Toivola J, Gilbert L, Michel P, White D, Vuento M, Oker-Blom C. 2005. Disassembly of structurally modified viral nanoparticles: characterization by fluorescence correlation spectroscopy. *C R Biol* 328(12):1052-1056.
- Torre ER, Steward O. 1992. Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *J Neurosci* 12(3):762-772.
- Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1995. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Molecular biology of the cell* 6(12):1887-1902.
- Tsvetkov AS, Samsonov A, Akhmanova A, Galjart N, Popov SV. 2007. Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell motility and the cytoskeleton* 64(7):519-530.
- Tucker RP, Garner CC, Matus A. 1989. In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron* 2(3):1245-1256.

V

- Vale RD, Fletterick RJ. 1997. The design plan of kinesin motors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:745-777.
- Valiron O, Caudron N, Job D. 2001. Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* 58(14):2069-2084.
- Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE. 2004. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 58(2):189-200.
- Verhey KJ, Gaertig J. 2007. The tubulin code. *Cell Cycle* 6(17):2152-2160.

W

- Wade RH, Chretien D, Job D. 1990. Characterization of microtubule protofilament numbers. How does the surface lattice accommodate? *J Mol Biol* 212(4):775-786.
- Wagner OI, Lifshitz J, Janmey PA, Linden M, McIntosh TK, Leterrier JF. 2003. Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. *J Neurosci* 23(27):9046-9058.
- Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, Salmon ED. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of cell biology* 107(4):1437-1448.
- Wang H, Wang Z, Wang S, Li M, Nan L, Rhie JK, Covey JM, Zhang R, Hill DL. 2005. Preclinical pharmacology of epothilone D, a novel tubulin-stabilizing antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol* 56(3):255-260.
- Wang YL. 1985. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmill. *The Journal of cell biology* 101(2):597-602.
- Washbourne P, Cansino V, Mathews JR, Graham M, Burgoyne RD, Wilson MC. 2001. Cysteine residues of SNAP-25 are required for SNARE disassembly and exocytosis, but not for membrane targeting. *Biochem J* 357(Pt 3):625-634.
- Webb BC, Wilson L. 1980. Cold-stable microtubules from brain. *Biochemistry* 19(9):1993-2001.
- Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG. 1987. Assembly and turnover of deetyrosinated tubulin in vivo. *The Journal of cell biology* 105(1):265-276.
- Wegner A. 1976. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* 108(1):139-150.

- Wehland J, Weber K. 1987. Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J Cell Sci* 88 (Pt 2):185-203.
- Weinberger DR, Egan MF, Bertolino A, Callicott JH, Mattay VS, Lipska BK, Berman KF, Goldberg TE. 2001. Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50(11):825-844.
- Weisenberg RC. 1972. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science (New York, NY)* 177(54):1104-1105.
- Westermann S, Weber K. 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature reviews* 4(12):938-947.
- Wittmann T, Bokoch GM, Waterman-Storer CM. 2004. Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1. *The Journal of biological chemistry* 279(7):6196-6203.
- Wittmann T, Desai A. 2005. Microtubule cytoskeleton: a new twist at the end. *Curr Biol* 15(4):R126-129.

X

- Xia Z, Storm DR. 2005. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nature reviews* 6(4):267-276.
- Xu Z, Marszalek JR, Lee MK, Wong PC, Folmer J, Crawford TO, Hsieh ST, Griffin JW, Cleveland DW. 1996. Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter. *The Journal of cell biology* 133(5):1061-1069.
- Xue Y, Chen H, Jin C, Sun Z, Yao X. 2006. NBA-Palm: prediction of palmitoylation site implemented in Naive Bayes algorithm. *BMC Bioinformatics* 7:458.

Y

- Yanagisawa T, Hasegawa S, Mohri H. 1968. The bound nucleotides of the isolated microtubules of sea-urchin sperm flagella and their possible role in flagellar movement. *Experimental cell research* 52(1):86-100.
- Yang Y, Wang XB, Frerking M, Zhou Q. 2008. Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *J Neurosci* 28(22):5740-5751.
- Ye B, Zhang Y, Song W, Younger SH, Jan LY, Jan YN. 2007. Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell* 130(4):717-729.

Z

- Zambito AM, Wolff J. 2001. Plasma membrane localization of palmitoylated tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* 283(1):42-47.
- Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N. 2001. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105(5):587-597.
- Zhao L, Lobo S, Dong X, Ault AD, Deschenes RJ. 2002. Erf4p and Erf2p form an endoplasmic reticulum-associated complex involved in the plasma membrane localization of yeast Ras proteins. *The Journal of biological chemistry* 277(51):49352-49359.
- Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378(6557):578-583.
- Zhou F, Xue Y, Yao X, Xu Y. 2006. CSS-Palm: palmitoylation site prediction with a clustering and scoring strategy (CSS). *Bioinformatics* 22(7):894-896.
- Zhou FQ, Waterman-Storer CM, Cohan CS. 2002. Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *The Journal of cell biology* 157(5):839-849.
- Zito K, Knott G, Shepherd GM, Shenolikar S, Svoboda K. 2004. Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. *Neuron* 44(2):321-334.

Caractérisation d'une nouvelle protéine associée aux microtubules, SL21

Dans les neurones, les protéines associées aux microtubules E- et N-STOP (Early et adult neuronal Stable Tubule Only Polypeptide) sont deux effecteurs majeurs de la stabilité des microtubules. L'inactivation du gène *stop* chez la souris entraîne des défauts de la transmission synaptique associés à une réduction du nombre de vésicules synaptiques. Les neurones matures contiennent également une protéine apparentée aux protéines STOPS, la protéine SL21 (STOP like protein of 21 kDa) qui possède deux zones homologues aux protéines STOPS : un domaine de liaison et de stabilisation des microtubules et une région de 35 acides aminés située à l'extrémité amino-terminale. SL21 se localise au niveau des microtubules mais également au niveau de l'appareil de Golgi.

La première partie de ce travail est consacrée à la caractérisation fonctionnelle du domaine amino-terminal. Il contient 3 résidus cystéines en position 5, 10 et 11 qui peuvent être palmitoylées (modification permettant l'association des protéines aux membranes). Nous avons montré que les cystéines 5 et 11 de SL21 sont palmitoylables mais que seule la cystéine 5 est suffisante et nécessaire pour localiser SL21 au niveau de l'appareil de Golgi. Nous avons également mis en évidence que la protéine N-STOP, en plus d'être localisée aux microtubules, s'associe également au Golgi par l'intermédiaire de son domaine amino-terminal palmitoylable.

Dans la deuxième partie de ce travail, afin de mieux comprendre la fonction de SL21, nous avons choisi de nous intéresser aux partenaires de SL21. Un test en double-hybride a été réalisé. Trois partenaires potentiels ont été mis en évidence : la protéine Tctex1, une des chaînes légère du moteur moléculaire dynéine, les protéines SL21 et STOPS elles même. Nous avons confirmé l'interaction de ces protéines avec SL21 par co-immunoprécipitation en utilisant des lysats de cellules transfectées et des extraits de cerveau. Nous avons également déterminé leur site d'interaction au niveau de SL21. Tctex1 interagit avec SL21 au niveau de son module de liaison aux microtubules, le site de multimérisation de SL21 se localise au niveau du domaine amino-terminal.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en évidence une nouvelle localisation aux membranes des protéines STOPS et SL21. Cette propriété pourrait être essentielle pour expliquer le rôle des STOPS à la synapse.

Mots-clés : SL21, STOP, palmitoylation, multimerisation, microtubules, Golgi, vésicules, neurone, Tctex1

Characterisation of a new microtubule associated protein, SL21

The early and adult neuronal microtubule-associated proteins STOP (Stable Tubule Only Polypeptide) are the main effectors of neuronal microtubule stability. STOP null mice exhibit synaptic plasticity defects with depleted synaptic vesicles pools suggesting a broader role for this protein than microtubule stabilisation. Mature neurons also contain a 21-kDa STOP like protein, SL21. This protein contains two STOP homologous domains: a microtubule binding and stabilizing domain and an amino-terminal part of 35 amino acids. SL21 decorates microtubules but is otherwise localized at the Golgi apparatus.

The first part of this thesis focuses on the functional characterisation of this amino-terminal domain. It contains three cysteine residues in position 5, 10 and 11. We find that cysteine 5 and 11 are palmitoylated. These modifications are often required for protein association with membrane and we demonstrate that cysteine 5 only is necessary for the Golgi localisation of SL21. The 3 cysteines are conserved in amino-terminal domain of STOP protein and we show that STOP protein, in addition to be localised at microtubules, could be associated with the Golgi apparatus.. Deletion of the amino-terminal domain of STOP prevents its Golgi localization, like SL21.

In the second part of this work, to understand the function of SL21, we chose to find its partners. Three proteins were shown to interact with SL21 in two-hybrid experiment: the protein Tctex1, one of the light chains of the dynein molecular motor, and the proteins SL21 and STOPS

themselves. We confirmed the interaction of these proteins with SL21 by co-immunoprecipitation using transfected cells and brain extracts. We also characterise their site of interaction on SL21. The protein Tctex1 interacts with SL21 on its module of binding microtubules, the multimerisation domain of SL21 is located on its amino-terminal domain.

From to this study, we show that SL21 and STOPs protein shares several properties: they both bind to microtubule and interact with membrane compartments. This novel function offers new perspectives to elucidate the role of SL21 and STOP in synapse.

Keywords: SL21, STOP, palmitoylation, multimerisation, microtubules, Golgi, vesicles, neurons, Tctex1